

FELIPE RAFAEL GARCÉS FIALLOS

**MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA
DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) A *Fusarium oxysporum* f.
*sp. phaseoli***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração de Recursos Genéticos Vegetais. Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik. Co-orientador: Prof. Dr. Jorge L. B. Oliveira

Florianópolis
2017

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

Garcés-Fiallos, Felipe Rafael
Mecanismos de defesa envolvidos na resistência
do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium*
oxysporum f. sp. *phaseoli* / Felipe Rafael Garcés
Fiallos ; orientador, Marciel João Stadnik ;
coorientador, Jorge Luiz Barcelos Oliveira. -
Florianópolis, SC, 2017.
75 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Murcha de
Fusarium. 3. Colonização vascular. 4. Enzimas. 5.
Vasos do xilema. I. Stadnik, Marciel João. II.
Barcelos Oliveira, Jorge Luiz. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV.
Titulo.

FELIPE RAFAEL GARCÉS FIALLOS

MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA DO
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) A *Fusarium oxysporum* f. sp.
phaseoli

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari,
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Marciel J. Stadnik,
Orientador,
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. João Américo Wordell Filho,
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Dra. Adriane Wendland Ferreira,
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

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

Dr. Eder Carlos Schmidt,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof., Dr. Paulo Emílio Lovato,
Universidade Federal de Santa Catarina

*Aos meus pais Rafael e Teresa, pelo amor, educação, apoio
incondicional e exemplo de vida.
À Rafael, meu primogênito amado.
Ao amor da minha vida Aline, pelo amor, respeito e apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade;

Ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) e a Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (Senescyt) pela concessão das bolsas de estudo;

Ao Prof. Dr. Marciel J. Stadnik, pela orientação, ensinamentos, incentivo e paciência ao longo do curso;

Ao Prof. Dr. Jorge L. B. Oliveira, pela co-orientação e ensinamentos relacionados as técnicas hidropônicas empregadas no trabalho. Assim também, aos amigos do Laboratório de Hidroponia – LabHidro, Gislaine, Marco, Mitsuo e Rafael, pelo apoio logístico;

Aos responsáveis pelo Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal – LFDG, Profs. Miguel P. Guerra e Rubens O. Nodari, e Técnico em Química André F. Knop, por permitirem a utilização dos equipamentos do laboratório;

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Celular Vegetal – LaBCeV, Profa., Dra. Zenilda L. Bouzon, Pós-Doutorandos Éder C. Schmidt e Carmen Simioni, assim como os Doutorandos Elisa P. Filipin, Débora T. Pereira e Marianne G. Kreush, por permitirem a utilização dos equipamentos do laboratório, auxílio nas análises de microscopia eletrônica e luz, assim como pela orientação dessa parte do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB, Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard e Técnicos Dra. (c) Chirle Ferreira e Me. Emily D. dos Santos, por permitirem a utilização dos equipamentos do laboratório e auxílio nas técnicas histoquímicas, assim como pela orientação dessa parte do trabalho;

Aos integrantes do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, especialmente a Biol. Eliana de Medeiros Oliveira, por permitir a utilização e manipulação dos microscópios eletrônico de varredura e de transmissão;

A todos os colegas e amigos da Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela amizade, parceria e convivência, Alessandro, Aline, Daniel, Edison, Fernando, Juan, Lido, Liliana, Mathias, Ramón, Tomás, Virgílio, e em especial ao meu parceiro Mateus B. de Freitas;

Aos colegas e amigos do grupo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Marlon C. de Borba e Felipe M. de Quadros pelo apoio e parceria durante a realização deste trabalho;

A toda a minha família pela força e torcida;

A aos demais amigos, colegas e conhecidos que fiz longe da minha terra e que contribuíram para a consecução deste trabalho.

Muito obrigado a todos!

*“Não reclame se a terra não é boa;
Que o clima não é favorável;
Não lhe cabe julgar a terra ou o tempo;
Tua missão é semear”
Vade Bernaski.*

MECANISMOS DE DEFESA ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) A *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

RESUMO

Existe pouca informação sobre a colonização vascular do feijão comum por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), bem como sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro frente ao ataque patogênico. Assim, o trabalho objetivou estudar a colonização vascular espaço-temporal de plantas de feijão comum dos genótipos UFSC-01 e Uirapuru por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e mecanismos físicos e químicos de defesa do hospedeiro. Na primeira parte do trabalho, a incidência e severidade da Murcha de Fusarium (MF), descoloração vascular do hipocótilo, unidades formadoras de colônias (ufc) e ergosterol foram quantificadas em tecidos da raiz, hipocótilo e epicótilo, aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após inoculação (dai). A colonização vascular também foi monitorada em secções dessas partes da planta e na coroa a 1, 3, 5 e 25 dai. Na segunda parte, sintomas externos e internos foram avaliados no sistema radicular e hipocótilos aos 25 dai. No sistema radicular e hipocótilos desses tecidos, foi monitorada a atividade das enzimas guaiacol peroxidase (GPX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) a 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dai. Nessas partes, também foi determinado o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides e lignina, a 0, 3 e 6 dai. Secções da raiz principal e hipocótilo foram analisadas com microscópio de epifluorescência a 1, 3 e 6 dai. Nesse último tempo, secções ultrafinas desses tecidos foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Determinações de cfu e ergosterol conduziram a resultados semelhantes, mostrando que o fungo colonizou mais eficientemente plantas suscetíveis. *Fop* cresceu intercelularmente até alcançar os vasos do xilema das raízes principais. Depois disso, o patógeno começou a colonizar partes superiores pela produção de uma grande quantidade de conídios dentro dos vasos do xilema. Sintomas precoces e fortes em plantas suscetíveis foram associados a uma rápida colonização e um colapso dos vasos do xilema em tecidos aéreos. Em contraste, vasos de plantas resistentes permaneceram sem ser afetados e o atraso na colonização foi associada com a fraca formação/transporte de conídios em vasos de tecidos da raiz principal e a coroa. Uma precoce, maior e rápida atividade das enzimas GPX, PAL e PPO, aliado a uma parede celular espessa dos vasos do xilema, são importantes na defesa de feijão comum a *Fop*. As vesículas, além de inibir quimicamente o

crescimento do patógeno, podem formar parte do material de oclusão no interior dos vasos do xilema de plantas resistentes.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*; Murcha de Fusarium, colonização vascular, enzimas, vesículas, vasos do xilema

DEFENSE MECHANISMS INVOLVED IN THE RESISTANCE OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) TO *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

ABSTRACT

There is a lack of information on the vascular colonization of common bean by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), as well as the host defense mechanisms against the pathogen. Thus, this work was aimed to study the space-temporal vascular colonization of UFSC-01 and Uirapuru common bean plants by *Fop* and physical and chemical defense mechanisms of host. In the first part of the work, incidence and severity of Fusarium wilt (Fw), vascular discoloration in hypocotyls, colony forming units (cfu) and ergosterol were quantified on root, hypocotyl and epicotyl tissues, at 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days after inoculation (dai). Fungal colonization was also monitored by light microscopy of cross sections from the mentioned plants parts as well as root crown at 1, 3, 5 and 25 dai. In the second part, external and internal symptoms of Fw were quantified in plants, at 25 dai. guaiacol peroxidase (GPX), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) activity were monitored in system roots and hypocotyls at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 dai. In these tissues, total phenolics, flavonoids and lignin content were determined at 0, 3 and 6 dai. At the last time, ultrafine sections of these tissues were analyzed by transmission electron microscopy. Cfu and ergosterol determinations lead to similar results showing that fungus colonized more efficiently susceptible plants. *Fop* grew intercellularly until reaching the xylem vessels of taproots. Thereafter, it started to colonize upper parts by producing a large amount of conidia inside plant vessels. Earlier and stronger symptoms on susceptible plants were associated to both faster colonization and collapse of xylem vessels in aerial tissues. In contrast, vessels of resistant plants remained unaffected, and delayed colonization was associated with weak formation/transport of conidia in vessels of taproot and root crown. An early, larger and faster activity of the GPX, PAL and PPO enzymes, together with a thick cell wall of xylem vessels, are important in the defense of common bean to *Fop*. Vesicles besides inhibiting to chemically the growth of the pathogen, may form part of the occlusion material inside xylem vessels of resistant plants.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; Fusarium wilt, vascular colonization, enzymes, vesicles, xylem vessels

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A, Crescimento do patógeno sobre meio de cultura BDA (batata dextrose ágar); B, Microconídios com três a quatro septos; C, Macroconídios; D, Clamidósporos terminais e intercalares; E, Fiálide produzindo um macroconídios; F, Fiálides produzindo microconídios sobre a epiderme do hipocótilo de uma planta de feijão infectada. CI: clamidósporo intercalar. CT: clamidósporo terminal. Barras: A: 1 cm; B-E: 20µm; F: 100µm 30

Figura 1.2. Sintomas de Murcha de *Fusarium* em plantas de feijão comum causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A, Plântulas mostrando folhas com amarelecimento prematuro, murcha, áreas cloróticas encharcadas nas margens e defoliação; B, Murcha, clorose, defoliação completa e descoloração vascular na coroa e no hipocótilo; C, Nanismo; D, Produção de vagens vazias, pequenas ou pouco cheias; E-F, massa conidial rosada externa no caule de plântulas (E) ou plantas mortas (F) .. 34

Figura 1.3. Desenvolvimento e ciclo da Murcha de *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no feijoeiro. Seta indica crescimento micelial intercelular no córtex e produção de microconídios no interior dos vasos do xilema, na raiz e hipocótilo, respectivamente. Ep: epiderme; Co: córtex; Sv: sistema vascular; Vx: vasos do xilema; Me: medula 36

Capítulo 2

Figura 2.1. Colonização vascular espacial-temporal de plantas de feijão UFSC-01 (R) e Uirapuru (S) a 1, 3, 5 and 25 dias após inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Número de células do xilema infectado em tecidos do sistema radicular (SR: raiz principal e laterais), coroa (C), hipocótilo (H), epicótilo inferior (EI) e epicótilo superior (ES). Amostras (secções de 4 µm) foram coradas com azul de toluidina 0.5% 50

Capítulo 3

Figure 3.1. Diferenças nas enzimas guaiacol peroxidase (GPX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO), 59

fenólicos totais (FT), flavonoides (FL) e conteúdo de lignina (CL), e autofluorescência, entre tecidos ou secções do xilema de raízes e hipocótilos infectados e não infectados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, avaliados entre 0 e 6 dias após inoculação

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BDA	Batata dextrose ágar
dai	Dias após a inoculação
<i>Fop</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>
<i>Fop6</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> raça 6
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
MF	Murcha de Fusarium
O ₂ •-	Ânion superóxido
PAL	Fenilalanina amônia-liase
POX	Guaiacol peroxidase
<i>POX</i>	Peroxidase secretor
PPO	Polifenol oxidase
TDFs	Fragmentos derivados de transcritos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2. OBJETIVOS	25
2.1. GERAL	25
2.2. ESPECÍFICOS	25
3. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1. CULTURA DO FEIJOEIRO	27
3.2. FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO FEIJOEIRO	28
3.3. MURCHA DE FUSARIUM EM FEIJÃO COMUM	28
3.3.1. ETIOLOGIA	29
3.3.2. TAXONOMIA	29
3.3.3. RAÇAS	31
3.3.4. HOSPEDEIROS	32
3.3.5. SINTOMATOLOGIA	35
3.4. COLONIZAÇÃO VASCULAR DE PLANTAS POR <i>Fusarium oxysporum</i>	33
3.5. MECANISMOS DE DEFESA EM PLANTAS CONTRA <i>Fusarium oxysporum</i>	37
3.5.1. MECANISMOS BIOQUÍMICOS	38
3.5.1.1. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE LIGNINA	38
3.5.2. MECANISMOS FÍSICOS	40
3.5.2.1. LIGNINA	40
3.5.2.2. REVESTIMENTO VASCULAR	41
3.5.2.3. MATERIAL DE OCLUSÃO NOS VASOS DO XILEMA	42
3.5.2.4. TILOSES	43
4. CAPÍTULO 2 – COLONIZAÇÃO ACROPETAL TARDIA DOS VASOS DO XILEMA ESTÁ ASSOCIADA COM A RESISTÊNCIA DE FEIJÃO COMUM A <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. phaseoli</i>	45
4.1. INTRODUÇÃO	46
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.3. RESULTADOS	48
4.4. CONCLUSÃO	50
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
5. CAPÍTULO 3 – RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO A <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. <i>sp. phaseoli</i> ESTÁ ASSOCIADA A PAREDES ESPESAS E MATERIAL DE OCLUSÃO NOS VASOS DO XILEMA	53

5.1. INTRODUÇÃO	54
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	55
5.3. RESULTADOS	57
5.4. CONCLUSÃO	59
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6. CONCLUSÕES GERAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil a produtividade média do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é de apenas 939 kg ha⁻¹, com acentuada variação entre os sistemas tecnificados de produção e aqueles baseados em agricultura de subsistência, geralmente conduzidos em pequenas propriedades (BLAIR et al. 2013). Entre os fatores que podem afetar negativamente o rendimento potencial dessa cultura, estão as doenças como a Murcha-de-Fusarium (MF) causada pelo fungo necrotrófico *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *phaseoli* JB Kendrick & WC Snyder (*Fop*). Desde que MF foi descrita pela primeira vez por CARDOSO et al. (1966), causando danos no rendimento em feijão comum, está largamente disseminada em todo o território nacional, principalmente em áreas de monocultura (WORDELL et al., 2013). Os danos podem ser expressivos sob condições de temperatura mais elevada (PEREIRA et al., 2011), atingindo em alguns casos o 100% (SINGH; SCHWARTZ, 2010).

Genótipos resistentes são recomendados como uma estratégia conveniente e eficaz para o controle da doença (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; BURUCHARA; CAMACHO, 2000), no entanto, o desenvolvimento e lançamento de novos cultivares com amplo espectro de resistência têm sido difícil devido à alta variabilidade do patógeno (SALGADO; SCHWARTZ, 1993). Além da raça 2 de *Fop* que parecia ser a predominante no Brasil, outros patótipos e raças altamente virulentas, como a raça 6, foram recentemente identificados (HENRIQUE et al., 2015). Fontes de novos genes de resistência são muito escassos e ainda não estão disponíveis contra a maioria deles (XUE et al., 2015).

A infecção das plantas por *F. oxysporum* é um processo complexo que compreende várias fases de interação patógeno-hospedeiro como o reconhecimento das raízes de acolhimento e de adsorção, a penetração de hifas através dos diferentes tecidos da raiz, penetração e progressão no xilema, e adaptação ao ambiente interno da planta (ZVIRIN et al., 2010). O reconhecimento de patógenos vasculares é mediado por receptores extras ou intracelulares que conduzem à ativação de respostas de defesa nos vasos do xilema (YADETA; THOMMA, 2013). Na fase prevascular, plantas dependem fortemente de uma ativação rápida e eficiente e de seus mecanismos de defesa para combater a invasão do patógeno. Caso contrário, o sistema vascular pode ser comprometido mais tarde. Depois de atingir o interior dos vasos do xilema de raízes (XUE et al., 2015), *F. oxysporum* se espalha rapidamente para tecidos aéreos (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015). Nessa fase, conídios transportados pela corrente da seiva, germinam e as hifas penetram a

parede de vasos, produzindo mais microconídios nos próximos vasos (BECKMAN, 1987). Esses processos requerem a adaptação do patógeno ao ambiente interno da planta. Assim, patógenos vasculares têm se adaptado para colonizar o xilema, que é conhecido como um meio pobre em nutrientes, causando assim murcha vascular em plantas (YADETA; THOMMA, 2013; NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015). A eficiente colonização dos tecidos aéreos causa sintomas como a clorose, desfolha, nanismo e murcha (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000). Após a morte da planta, o fungo cresce em caules mortos, e geralmente produz massas de conídios rosadas sobre eles (SALGADO; SCHWARTZ, 1993).

Em raízes resistentes, baixas taxas de colonização e respostas precoces de defesa estão negativamente relacionadas, quando comparadas às suscetíveis (ZVIRIN et al., 2010; XUE et al., 2014; 2015). Para combater a infecção de patógenos vasculares, plantas podem ativar um sistema imune de defesa nos vasos do xilema de forma coordenada, onde respostas físicas (material de oclusão e revestimento vascular) podem evitar que patógenos se espalhem nos vasos, enquanto, respostas químicas (vários compostos metabólicos, fitoalexinas, peroxidases e fenólicos) podem matar o patógeno ou inibir o seu crescimento (YADETA; THOMMA, 2013). Considerando a capacidade do *Fop* em colonizar os vasos do xilema e atingir os tecidos superiores (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015), estes dois mecanismos de resistência podem ser muito importantes em plantas de feijão comum.

Em feijão comum, atualmente existe pouca informação sobre os possíveis mecanismos de defesa utilizados contra *Fop*. Recentemente, XUE et al. (2015) identificaram diversos fragmentos derivados de transcritos (TDFs) em raízes resistentes que podem desempenhar um papel nas respostas de defesa. Entre estes, TDFs que codificam genes putativos relacionados a respostas hormonais, defesa e estresse, assim como um similar a uma peroxidase secretora. A sobre expressão desse TDFs, ativada pela infecção de *Fop*, pode ser correlacionada com o aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e guaiacol peroxidase (POX), assim como com o aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (XUE et al., 2014; 2015). Parece também, que o espessamento da parede celular dos vasos do xilema e o material de oclusão dentro dessas células observado em caules adultos, podem estar envolvidos com a resistência em feijão comum (PEREIRA et al., 2013).

Apesar desses estudos, não se conhece como, onde e quando ocorre o atraso de *Fop* na colonização dos vasos do xilema em tecidos

subterrâneos e aéreos de plantas de feijão, e quais são os mecanismos físicos e químicos de defesa ativados no hospedeiro. Recentes observações em câmara de crescimento, casa-de-vegetação e vasos ao ar livre, sugerem que o genótipo de feijão comum denominado UFSC-01 é resistente a MF. Esta linhagem tem demonstrado ser resistente à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e ter um elevado potencial de rendimento (DE FREITAS; STADNIK, 2012). Desta forma, este trabalho foi desenvolvido para estudar a colonização vascular espaço-temporal de feijão comum por *Fop*, assim como para esclarecer como e quando o patógeno é bloqueado ou inibido no hospedeiro, comparando plantas resistentes e suscetíveis.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a colonização vascular espaço-temporal de plantas de feijão comum dos genótipos resistente UFSC-01 e suscetível Uirapuru por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* raça 6 (*Fop6*) e os mecanismos físicos e químicos de defesa do hospedeiro.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a colonização vascular espaço-temporal de plantas resistentes e susceptíveis de feijão por *Fop6* utilizando técnicas convencionais (unidades formadoras de colônias), bioquímicas (conteúdo de ergosterol) e histoquímicas (coloração de tecidos com azul de toluidina O);
- Monitorar a atividade das enzimas guaiacol peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) na raiz e hipocótilo de plantas infectadas e não infectadas de feijão por *Fop6*;
- Quantificar o os compostos fenólicos totais, flavonoides e conteúdo de lignina na raiz e hipocótilo de plantas infectadas e não infectadas de feijão por *Fop6*;
- Detectar alterações morfo-anatômicas e ultraestruturais em secções de raiz e hipocótilo de plantas infectadas e não infectadas de feijão por *Fop6* usando microscopia de epifluorescência e eletrônica de transmissão.

3. CAPITULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um membro da família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subfamília Papilionoideae, sendo um cultivo anual herbáceo, com hábitos de crescimento determinado e indeterminado (GRAHAM; RANALLI, 1997). A espécie foi domesticada na América Latina a mais de 7000 anos (KAPLAN et al., 1973; GEPTS; DEBOUCK, 1991), identificando-se os Andes e Mesoamérica como centros de origem (SINGH et al., 1991a; GEPTS et al., 1986).

Segundo estudos da variabilidade de proteínas (faseolina) da semente (GEPTS; BLISS, 1986), aloenzimas (SINGH et al., 1991c), caracteres morfológicos da planta (SINGH et al., 1991b) e marcadores moleculares (NODARI et al., 1992), demonstrou-se a presença de dois centros de domesticação do feijão cultivado: Mesoamericano (América Central, Antilhas e México) e Andino. Esses dois acervos genéticos diferem em suas estruturas e níveis de diversidade genética, tanto em populações silvestres como nas domesticadas (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2013). No entanto, análise de isoenzimas e faseolinas, mostrou que as populações silvestres do Equador e do norte do Peru são intermediárias entre esses dois acervos anteriormente descritos. Esse material genético pode ter um papel importante na determinação da origem da espécie e como ponte entre os dois acervos (DEBOUCK et al., 1993). Segundo TOHME et al. (1995), esse seria o terceiro acervo genético da espécie. Contudo, recentemente BITOCCHI et al. (2012) fornecem evidências de uma origem Mesoamericana do feijão comum.

Possivelmente a dispersão da espécie desde os dois centros de origem seguiram rotas distintas (GRAHAM; RANALLI, 1997). Com relação à primeira, GEPTS (1988) sugere que as linhagens mesoamericanas de sementes menores (padrões de faseolina tipo “S”) seguiram a rota do México e América Central, através do Caribe e do norte da América do Sul para o Brasil. A introdução desses genótipos no Brasil se iniciou especificamente no México ou na Guatemala, passando pela Colômbia e a Venezuela até chegar ao país (GEPTS; DEBOUCK, 1991). A segunda rota foi desde os Andes, onde segundo GEPTS et al. (1988), foram introduzidos genótipos andinos de sementes maiores (padrões de faseolina tipo “T”). Estudos recentes indicam que o Brasil pode ser considerado como um centro secundário de diversificação do feijão comum (BURLE et al., 2010).

No Sul do Brasil existe tanto o tipo de feijão mesoamericano como o andino. Estudos bioquímicos e moleculares realizados por MACIEL et al. (1999; 2001; 2003), encontraram que vários dos genótipos crioulos e comerciais de feijão avaliados, possuem padrões de faseolina tipo “S” e “T”. Possivelmente os genótipos mesoamericanos foram introduzidos desde o México, e os andinos vieram desde a cordilheira dos Andes ou trazidos por imigrantes europeus (GEPTS et al., 1988).

3.2. FATORES QUE AFETAM A CULTURA DO FEIJOEIRO

Limitações à produtividade do feijão variam conforme a região, entre agricultores de subsistência na América Latina e na África Oriental, e produtores de maior escala comumente encontrados nos EUA e na Europa (GRAHAM; RANALLI, 1997). A produtividade dessa cultura é influenciada por diversos fatores, incluindo disponibilidade hídrica, fertilidade do solo, estande, sistema de cultivo e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças (WORDELL et al., 2013).

As doenças causadas por patógenos biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos estão entre os principais fatores que podem reduzir a produtividade do feijão. Esses microrganismos são mais importantes em regiões produtoras de feijão tropicais que em temperadas. Ambientes quentes e muitas vezes úmidos dos trópicos e sub-trópicos favorecem o desenvolvimento dos patógenos, enquanto que o plantio de 2-3 ciclos de cultivo consecutivos durante o ano favorece a continuidade do inóculo (GRAHAM; RANALLI, 1997).

3.3. MURCHA DE FUSARIUM EM FEIJÃO COMUM

Dentre as doenças foliares e radiculares que atacam o feijoeiro, pode-se destacar o amarelecimento ou murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*). Este patógeno é um dos fungos mais importantes dessa cultura, pois pode reduzir significativamente a produção das plantas na lavoura (WORDELL et al., 2013). Esta doença se tornou importante em algumas regiões do Brasil devido ao plantio sucessivo (BIANCHINI et al., 2005), estando praticamente disseminada em todo o território nacional, principalmente em áreas de monocultura (WORDELL et al., 2013).

O patógeno foi relatado pela primeira vez por HARTER em 1929 (ALOJ et al., 1987) na Califórnia, EUA. Posteriormente, provas de patogenicidade constataram que o fungo podia ser separado de outras formas especiais (*formae speciales*) de *F. oxysporum*, sendo proposto o

nome de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (KENDRICK; SNYDER, 1942). No Brasil, *Fop* foi relatado pela primeira vez no estado de São Paulo em outubro de 1966 por CARDOSO et al. (1966), causando sintomas típicos da doença na variedade Rosinha. Os danos na produção de grãos podem ser expressivos sob condições de temperatura mais elevada (PEREIRA et al., 2011), atingindo em alguns casos 100% (SINGH; SCHWARTZ, 2010).

3.3.1. Etiologia

Além do micélio, o fungo produz outras estruturas como microconídios, macroconídios e clamidósporos (Figura 1.1.). O micélio é hialino, septado e ramificado. Sobre meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), apresenta uma coloração avermelhada (Figura 1.1.A). Os microconídios são elípticos (Figura 1.1.B) e os macroconídios fusóides, ligeiramente curvos (Figura 1.1.C), com mais de 2 septos, medindo 3-6 x 25-35µm (BIANCHINI et al., 2005). Os clamidósporos podem ser intercalares ou terminais (Figura 1.1.D), medindo 2-4 x 6-15µm (BIANCHINI et al., 2005).

As células conidiógenicas são monofiálides curtas denominadas também de falsas cabeças (Figura 1.1.E-F). Uma característica que diferencia *F. solani* de *Fop*, é a formação de monofiálides longas (Nelson et al., 1983).

3.3.2. Taxonomia

O gênero *Fusarium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809, que detalhou a presença de conídios em forma de canoa ou banana, distintos dos conhecidos até a atualidade (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A espécie *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen, encontra-se dentro da secção Elegans (NELSON et al., 1983). A fase sexual do fungo ainda não foi descrita (LESLIE; SUMMERELL, 2006). O fungo que causa a murcha de MF em feijão comum é classificado da seguinte maneira (AGRIOS et al., 2005; GEISER et al., 2013):

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Classe: Sordariomycetes

Ordem: Hypocreales

Família: Nectriaceae

Gênero: *Fusarium*

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

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

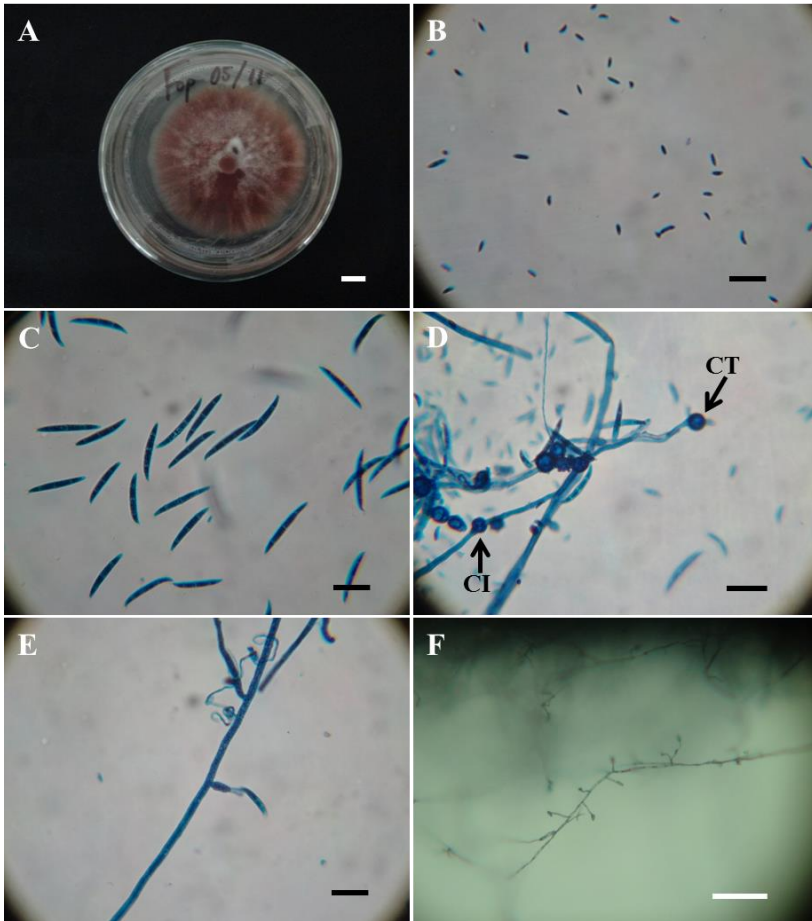


Figura 1.1. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A, Crescimento do patógeno sobre meio de cultura batata dextrose ágar (BDA); B, Microconídios com três a quatro septos; C, Macroconídios; D, Clamidósporos terminais e intercalares; E, Fíalide produzindo um macroconídios; F, Fíalides produzindo microconídios sobre a epiderme do hipocótilo de uma planta de feijão infectada. CI: clamidósporo intercalar. CT: clamidósporo terminal. Barras: A: 1 cm; B-E: 20 μ m; F: 100 μ m.

3.3.3. Raças

Embora as raças de *F. oxysporum* difiram em sintomatologia, epidemiologia e suscetibilidade, testes de patogenicidade apropriados podem auxiliar a diferenciar os genótipos (RONCERO et al., 2003). A diversidade e variação patogênica de *Fop* devem ser consideradas fatores importantes no processo de melhoramento para resistência do feijoeiro (SALGADO et al., 1995; WOO et al., 1996).

Inicialmente, RIBEIRO; HAGEDORN (1979a, b) descreveram duas raças de *Fop*. Isolados da Carolina do Sul, EUA e Holanda conformaram uma única raça (posteriormente designada raça 1), entretanto, isolados do Rio de Janeiro pertenceram a uma raça distinta, denominada pelos autores como raça brasileira (posteriormente designada raça 2). Na Itália, ALOJ et al. (1987) encontraram que um isolado italiano proveniente de Portici diferia da raça brasileira. Utilizando cultivares diferenciadores, SALGADO; SCHWARTZ (1993) encontraram diferenças entre os isolados ATCC18131 (Carolina do Sul, EUA), FOP-CL25 (Colômbia) e ATCC90245 (nordeste de Colorado, EUA), sendo posteriormente designados como raças 1, 3 e 4, respectivamente. Posteriormente, conheceu-se que isolados provenientes da Espanha, pertenciam a uma nova raça (VELÁSQUEZ-VALLE; SCHWARTZ 1998). Inclusive, vários desse isolados formaram grupos diferentes de compatibilidade vegetativa (VCGs) quando comparados com isolados provenientes do Brasil, Colômbia e EUA (Colorado e Carolina do Sul) (ALVES-SANTOS et al., 1999). Embora na época todos os autores ainda não tenham identificado as raças, eles observaram uma especialização fisiológica do patógeno.

A primeira descrição das raças de *Fop* foi realizada por WOO et al. (1996). Analisando 11 isolados e utilizando quatro metodologias (testes de patogenicidade-cultivares diferenciadores, VCGs, RAPD e RFLP), os autores encontraram as raças 2 (dois isolados do Brasil), 3 (quatro isolados da Colômbia) e 5 (dois isolados da Grécia), e, pela primeira vez, as raças 4 (um isolado de Colorado, EUA) e 1 (um isolado da Carolina do Sul, EUA e outro de Portici, Itália). Esse fato foi corroborado por ALVES-SANTOS et al. (2002), que além de agrupar nove isolados em três VCGs diferentes e encontrar a presença de dois grupos com uma clara diferença na virulência, esses indivíduos foram classificados pela primeira vez como as raças 6 (isolados de El Barco de Ávila, Espanha) e 7 (isolados de Chryssoupolis, Grécia).

No Brasil, NASCIMENTO et al. (1995) caracterizaram dezessete isolados patogênicos de *Fop* provenientes de São Paulo, Pernambuco e

Paraná, dentro da raça 2, descrita inicialmente como brasileira por RIBEIRO; HAGEDORN (1979a; b). No entanto, ZANOTTI et al. (2006) além de separar 11 isolados patogênicos de 9 não patogênicos utilizando RAPDs, encontraram que a distância entre os grupos patogênicos B (dois isolados) e G (um isolado) não foram compatíveis com os valores da distância observada dentro da raça. Esses autores concluíram que embora esses resultados sejam preliminares, era possível a existência de mais de uma raça deste fungo no país. Essa hipótese foi comprovada por WENDLAND et al. (2012). Utilizando a combinação de PCR e cinco cultivares diferenciadores em seis isolados coletados no Paraná, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Goiás, identificaram pela primeira vez no país, as raças 2 (isolados *Fop* 45 e *Fop* 46), 3 (*Fop* 48) e 6 (*Fop* 42 e *Fop* 51). Inclusive um isolado (*Fop* 02) não apresentou sintomas nos cultivares diferenciadores, embora o resultado da PCR tenha confirmado sua especificidade. Esse fato revelou a existência de novas raças do patógeno, as quais os cultivares diferenciadoras atuais não seriam capazes de identificar.

Recentemente foi encontrado que a variabilidade na patogenicidade de *Fop* é maior do que o relatado até agora, ou seja, que não está limitada às sete raças (HENRIQUE et al., 2015). Possivelmente, o cultivo contínuo de feijoeiro comum sob um alto potencial de inóculo pode estar associado a uma heterocariose frequente (maior variabilidade-raças), do que ocorreria em um sistema de rotação de culturas ou períodos de pousio entre uma cultura do feijão e a próxima. Atualmente, a ocorrência de heterocariose também pode ser facilitada pelo estabelecimento dessa cultura em áreas irrigadas, que a maioria das quais estão infestadas pelo patógeno (HENRIQUE et al., 2015).

3.3.4. Hospedeiros

Entre os potenciais hospedeiros secundários de *Fop* (DHINGRA; COELHO NETTO, 2001), encontram-se algumas leguminosas como feijão mangalô (*Dolichos lablab* L.), fava (*Phaseolus lunatus* L.), mucuna-preta (*Mucuna aterrima* Piper & Tracy), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.), feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), guandu (*Cajanus cajan* L. Mill), soja e crotalária (*Crotalaria spectabilis* Roth. e *C. juncea* L.). Essas espécies exceto soja e crotalária, podem apresentar inclusive colonização no caule (COELHO NETTO; DHINGRA, 1999). Assim também, a rizosfera de crotalária, fava e soja, podem exibir um maior percentual de germinação de clamidósporos (COELHO NETTO; DHINGRA, 2001).

Espécies como arroz, milho e sorgo também podem servir como hospedeiros, porém, essas espécies e crotalária (*C. juncea*) podem apresentar menor colonização radicular (entre 4 e 90 unidades formadoras de colônias g⁻¹ de tecido seco) em comparação com as leguminosas citadas anteriormente, podendo ser utilizadas em rotação com o feijoeiro (DHINGRA; COELHO NETTO, 2001). Espécies que não são boas hospedeiras, mas que estimulam a germinação dos clamidósporos, podem provavelmente favorecer a diminuição da população do patógeno pela ação de organismos antagonistas (COELHO NETTO; DHINGRA, 2001).

3.3.5. Sintomatologia

Os primeiros sintomas observados nas folhas primárias (Figura 2.1.A) são o amarelecimento prematuro, murcha, áreas cloróticas encharcadas nas margens e desfolhação (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000). Com o avanço da colonização de tecidos aéreos são observados sintomas (Figura 2.1.B e C) de murcha, clorose, nanismo pronunciado, desfolhação completa em algumas plantas e descoloração vascular na coroa e no hipocótilo (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000; NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015; XUE et al., 2015). Descoloração interna do caule pode ser observada em plantas sem sintomas externos de murcha (SALGADO; SCHWARTZ 1993).

Além dos sintomas previamente descritos, pode-se observar a produção de vagens vazias (BURUCHARA; CAMACHO, 2000), pequenas ou pouco cheias (Figura 2.1.D). Depois da morte, na parte externa do caule de algumas plântulas (Figura 2.1.E) e plantas adultas (Figura 2.1.F) pode ser observada uma massa conidial rosada (PASTOR-CORRALES; ABAWI 1987; SALGADO; SCHWARTZ 1993; DI PIETRO et al., 2003).

3.4. COLONIZAÇÃO VASCULAR DE PLANTAS POR *Fusarium oxysporum*

As principais fontes de inóculo de *Fop* são clamidósporos (Figura 1.3.) que permanecem no solo ou em restos de cultura durante um longo período de tempo na ausência do hospedeiro (KENDRICK; SNYDER, 1942; ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990), assim como sementes infectadas introduzidas em uma lavoura (SOUSA et al., 2014). Embora seja observada uma rede de hifas sobre a superfície da raiz principal e das raízes laterais de feijão, parece que as junções entre esses dois tecidos são

preferidas pelo patógeno (Figura 1.3.) para a penetração (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015).

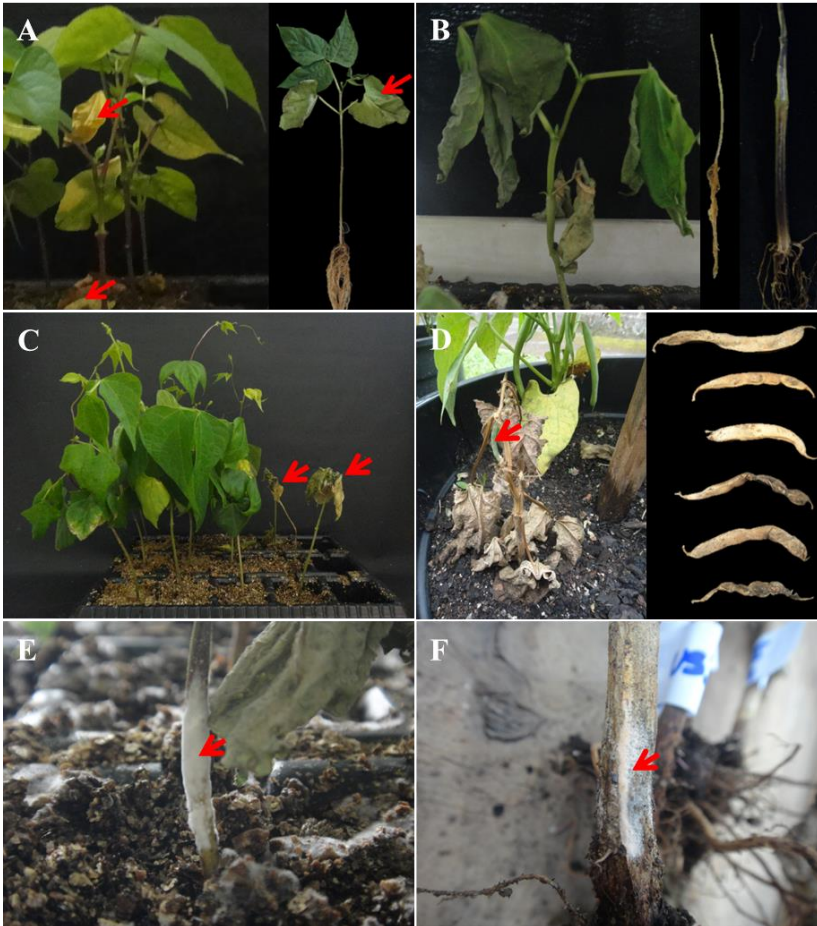


Figura 1.2. Sintomas de Murcha de *Fusarium* em plantas de feijão comum causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. A, Plântulas mostrando folhas com amarelecimento prematuro, murcha, áreas cloróticas encharcadas nas margens e desfolhação; B, Murcha, clorose, desfolhação completa e descoloração vascular na coroa e no hipocótilo; C, Nanismo; D, Produção de vagens vazias, pequenas ou pouco cheias; E-F, Massa conidial rosada sobre a superfície do caule de plântulas (E) e plantas adultas (F).

Em plantas de feijão (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015) e grão de bico (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013), *F. oxysporum* coloniza as raízes do córtex até atingir os vasos do xilema. *Fop* pode atingir o xilema de plantas de feijão entre 1,5 e 4 dias após a inoculação (dai; GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2010; XUE et al., 2012; 2015). No entanto, a velocidade com que o patógeno atinge essas células depende do isolado (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015) ou da interação entre o hospedeiro e o patógeno (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; XUE et al., 2015). Patógenos vasculares como *Fop* (Figura 1.3.) são caracterizados pela sua capacidade de colonizar o sistema vascular do hospedeiro (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2010; NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015).

Uma vez que o patógeno atinge os feixes vasculares, dispersa-se rapidamente para os tecidos aéreos provocando os primeiros sintomas (BECKMAN, 1987; BURUCHARA; CAMACHO, 2000) nas primeiras folhas (Figura 1.3.). Talvez nessa fase, microconídios observados nos vasos do xilema de raízes de feijão por microscopia eletrônica de varredura, após 4 dias da inoculação com *Fop* (XUE et al. 2015), sejam importantes para disseminar o fungo para tecidos aéreos (Figura 1.3.). De fato, essas estruturas do patógeno são separadas e levadas para cima na corrente de seiva, onde, eventualmente, germinam e as hifas penetram a parede dos vasos do xilema, produzindo mais microconídios nos próximos vasos (BECKMAN, 1987; DI PIETRO et al., 2013).

Fop é um colonizador vascular especializado (Figura 1.3.), e por razões ainda desconhecidas acumula uma quantidade maior de micélio em regiões aéreas de plantas (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015). Com a finalidade de proliferar suas hifas e produzir conídios dentro dos vasos do xilema, o patógeno precisa-se adaptar ao ambiente hostil da planta através da resistência a compostos antifúngicos e fitoalexinas, (DI PIETRO et al., 2003; RONCERO et al., 2003; ZVIRIN et al., 2010) e obter os nutrientes de células do parênquima do xilema (DIVON et al., 2006; YADETA; THOMMA, 2013).

Uma vez que o caule de feijão (Figura 1.3.) é intensamente colonizado por *Fop* (BURUCHARA; CAMACHO, 2000, XUE et al., 2012; 2015), os vasos do xilema colapsam, produzindo uma drástica redução no transporte de água à parte aérea das plantas, podendo provocar finalmente sua morte (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2005). As plantas afetadas têm uma diminuição do movimento simplástico da água nos vasos por alterações na permeabilidade das paredes secundárias (BISHOP; COOPER, 1983). A murcha como consequência da disfunção do xilema é o sintoma mais evidente dos patógenos causadores de murcha vascular (YADETA; THOMMA, 2013). Esses sintomas podem ser originados por

uma combinação de atividades, tais como o acúmulo de micélio fúngico, produção de toxinas, e respostas de defesa do hospedeiro como géis, gomas e tilose (BECKMAN, 1987; DIVON et al., 2006). No entanto, formação de tilose tem sido geralmente associada com resistência a fungos patogênicos vasculares (YADETA; THOMMA, 2013).

Em estágios avançados da doença (após a morte da célula hospedeira) podem ser observados clamidósporos, macroconídios e abundante micélio (BURUCHARA; CAMACHO, 2000; HALL et al., 2013; NIÑO-SANCHEZ et al., 2015). A formação de clamidósporos em tecidos vegetais parece ser induzida pela degradação das células do hospedeiro (HALL et al., 2013) e necessidade de nutrientes do fungo (DIVON et al., 2006).

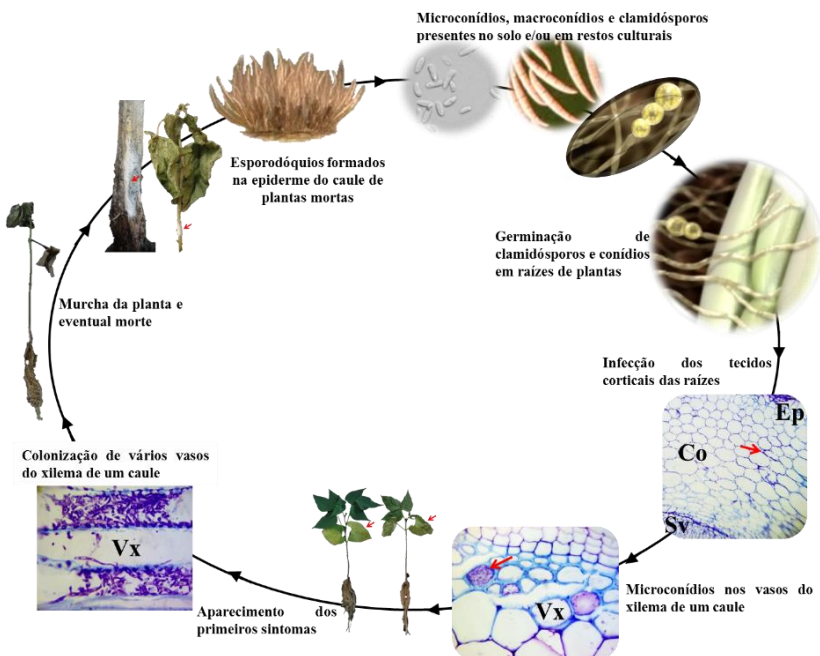


Figura 1.3. Desenvolvimento e ciclo da Murcha de *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no feijoeiro. Setas indicam crescimento micelial intercelular no córtex e produção de microconídios no interior dos vasos do xilema, nos tecidos da raiz e do hipocótilo, respectivamente. Ep: epiderme; Co: córtex; Sv: sistema vascular; Vx: vasos do xilema; Me: medula.

Após a morte da planta, uma massa conidial rosada de *Fop* (Figura 1.3.) pode ser observada sobre a superfície do caule de plantas mortas (PASTOR-CORRALES; ABAWI 1987; SALGADO; SCHWARTZ, 1993), constituída principalmente por esporódoquios. Essas estruturas patogênicas podem servir como fonte de inóculo para plantas saudáveis adjacentes ou para aumentar o número de propágulos no solo para infectar os próximos plantios.

Após a colheita, sementes contaminadas constituirão o principal potencial de disseminação a longas distâncias (SANTOS et al., 1996). De fato, a incidência de *Fop* nas sementes está entre 1 e 14%, entretanto, a taxa de transmissão pode atingir 43% (SANTOS et al., 1996; SOUSA et al., 2014).

3.5. MECANISMOS DE DEFESA EM PLANTAS CONTRA *Fusarium oxysporum*

A infecção das plantas por *F. oxysporum* é um processo complexo que compreende várias fases de interação patógeno-hospedeiro como o reconhecimento das raízes do hospedeiro e adsorção, penetração de hifas através dos diferentes tecidos da raiz, penetração e progressão no xilema, e adaptação ao ambiente interno da planta (ZVIRIN et al., 2010). Reconhecimento de patógenos que originam murcha vascular é mediado por receptores extra ou intracelulares que ativam respostas de defesa nos vasos do xilema (YADETA; THOMMA, 2013). Na fase prevascular, plantas podem depender fortemente de uma ativação rápida e eficiente dos seus mecanismos de defesa para combater a invasão do patógeno. Caso contrário, o sistema vascular pode ser comprometido posteriormente.

Antes de atingir o interior dos vasos do xilema, patógenos vasculares precisam romper as paredes altamente estruturadas e rígidas dessas células (YADETA; THOMMA, 2013). Em raízes resistentes existe uma relação negativa entre taxas mais baixas de colonização e respostas precoces de defesa, quando comparadas a suscetíveis (ZVIRIN et al., 2010; XUE et al., 2014; 2015). Plantas podem ativar um sistema imune de defesa nessas células do xilema de forma coordenada, que consistem em respostas físicas (material de oclusão e revestimento vascular) e químicas (vários compostos metabólicos, fitoalexinas, peroxidases e fenólicos). Possivelmente, pela capacidade que *Fop* possui de colonizar vasos do xilema e atingir tecidos superiores (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015), esses dois mecanismos de resistência podem ser muito importantes para o feijoeiro.

3.5.1. Mecanismos bioquímicos

3.5.1.1. Enzimas envolvidas na síntese de lignina

A infecção do xilema por patógenos pode provocar alterações metabólicas drásticas no parênquima do xilema, localizadas junto aos vasos infectados. Essas alterações conduzem à acumulação de diferentes proteínas e metabolitos secundários no xilema (YADETA; THOMMA, 2013). Entre os principais mecanismos de defesa bioquímicos em plantas, encontram-se algumas enzimas como guaiacol peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) (BELL et al., 1981). Essas enzimas desempenham um papel importante na biossíntese da lignina (DE ASCENSÃO; DUBERY, 2000; MANDAL; MITRA, 2007). Em geral, o aumento da atividade dessas enzimas pode induzir um aumento de lignina em plantas infectadas (BELL et al., 1981)

Guaiacol peroxidase (POX)

POX polimeriza o álcool hidroxicinâmico em presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), originando lignina (BELL et al., 1981). Essa enzima está envolvida na produção/remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são compostos tóxicos que podem eliminar agentes patogênicos causadores de murcha vascular (YADETA; THOMMA, 2013). A reticulação cruzada (cross-linking) de proteínas como POX pode ser importante durante a polimerização de monómeros de lignina, na fase inicial da lignificação da parede primária de células vegetais (WHITMORE et al., 1978). Rápidas modificações como a reticulação cruzada de proteínas estruturais e outros polímeros mediados por POX, podem melhorar a eficácia da parede celular como uma barreira para retardar a propagação do patógeno (MANDAL et al., 2008). Na parede de células infectadas por patógenos vasculares, peroxidases extracelulares ligadas à parede parecem estar envolvidas na polimerização de precursores de lignina e na reticulação cruzada de polissacarídeos (HRUBCOVA et al., 1992).

POX cumpre um papel importante nas respostas de defesa em tecidos vegetais ao ataque de patógenos como *Fop* (XUE et al., 2015), podendo ser incrementada em raízes em resposta a *F. oxysporum* (DE ASCENSAO; DUBERY, 2000; MANDAL et al. 2008; XUE et al., 2014). Essa enzima, além de ser acumulada abundantemente no xilema durante a colonização de tecidos vegetais por patógenos vasculares (YADETA; THOMMA, 2013), possui atividade antifúngica. De fato, uma peroxidase

isolada de plantas de feijão francês (*P. vulgaris* cv. Kentucky wonder) exerce atividade antifúngica contra uma variedade de patógenos incluindo *F. oxysporum* (YE; NG, 2002).

Fenilalanina amônia-liase (PAL)

PAL catalisa a primeira reação na via dos fenilpropanóides, gerando vários produtos a partir de fenilalanina, como lignina, flavonoides e compostos fenólicos (ARDILA et al., 2013). Essa enzima converte fenilalanina em ácido cinâmico (BELL et al., 1981), que está envolvida na síntese de metabólitos secundários que reforçam a parede celular ou que possuem capacidade antimicrobiana em plantas (CHANG et al., 2008). Por outro lado, a expressão de transcritos de PAL assim como a sua atividade, podem ser correlacionados com a acumulação de lignina e fitoalexinas (CHANG et al., 2008).

Embora a atividade de PAL possa aumentar em raízes resistentes infectadas por *F. oxysporum* (DE ASCENSAO; DUBERY, 2000; EL MODAFAR et al., 2006; XUE et al., 2015), essa enzima também pode diminuir em tecidos infectados. Por exemplo, a diminuição da atividade de PAL na coroa de plântulas de melancia inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, pode ser devido a efeitos secretados pelo fungo. No entanto, ela ocorre por um curto período de tempo (CHANG et al., 2008). Em contraste, em plantas suscetíveis a atividade dessa enzima pode ser suprimida pelo patógeno (EL MODAFAR et al., 2006).

Polifenol oxidase (PPO)

PPO é uma enzima com um centro de cobre binuclear, capaz de inserir oxigênio em um grupo hidroxilo existente em um anel aromático, seguido da oxidação de difenol para quinona (MAYER, 2006). As quinonas podem ser altamente tóxicas e estar envolvidas na oxidação terminal do tecido de plantas doentes (KAVINO et al., 2009). Essa enzima atua também na polimerização de monolignóis dentro de olignóis, moléculas precursoras de lignina (DE ASCENSAO; DUBERY, 2000).

PPO pode ser microscopicamente observada em paredes lignificadas dos vasos do xilema de hipocótilos de feijão (CHABANET, 1994). Por outro lado, a ativação dessa enzima e do metabolismo dos fenóis na parede dos vasos e espaços intercelulares na maior parte no parênquima do xilema, pode ser utilizado por plantas para confinar

lateralmente *F. oxysporum* nessas células, especialmente nos vasos (DEVECCHI; MATTA, 1988).

3.5.2. Mecanismos físicos

3.5.2.1. Lignina

A lignina é um polímero aromático composto principalmente de álcoois cinâmílicos que se originam a partir do ácido cinâmico (o produto da enzima PAL) (MANDAL; MITRA, 2007). Nas angiospermas, a lignina é tipicamente dominada por duas estruturas monoméricas: uma com um padrão de substituição do anel 3'-metoxi-4'-hidroxi (contribuindo para guaiacil ou G-lignina), e outra com um padrão 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi (contribuindo para siringil ou S-lignina) (SCHUETZ et al., 2013). No entanto, a composição desse polímero varia entre as diferentes células do xilema. De fato, os vasos possuem paredes celulares secundárias compostas principalmente de G-lignina (álcool coniferílico), enquanto que as fibras, tais como as interfasciculares, são de S-lignina (álcool sinapílico) (SCHUETZ et al., 2013). Por outro lado, a composição da lignina nos vasos pode mudar com a idade. É conhecido que a lignina principalmente do tipo guaiacil observada em tecidos muito jovens, pode mudar para uma lignina guaiacil-siringil em tecidos mais velhos (NIEMANN et al., 1990).

Em tecidos vegetais, a lignina pode ser encontrada na lamela média, na parede celular secundária dos elementos de vasos e fibras, e ocasionalmente localizada também nas paredes de células epidérmicas e hipodérmicas (AGRIOS, 2005). Os monolignóis que participam na polimerização da estrutura final da lignina tem que movimentar-se do seu local da síntese, através da membrana plasmática à parede celular (SCHUETZ et al., 2013). Embora a celulose forme parte tanto da parede celular primária ou secundária do xilema (SCHUETZ et al., 2013), análises histoquímicas em raízes infectadas com *F. oxysporum*, mostram que a lignina está depositada na parede secundária dos vasos do xilema (JORDAN et al., 1988). Parece que a lignificação observada nos elementos de vaso, contribui substancialmente à funcionalidade dessas células (SCHUETZ et al., 2013). Por exemplo, no protoxilema, a polimerização de lignina é restrita a zonas helicoidais ou anulares da parede secundária (SCHUETZ et al., 2013).

A lignina constitui uma barreira estrutural que pode limitar a propagação do agente patogênico e evitar a difusão de enzimas extracelulares e toxinas do patógeno (MANDAL; MITRA, 2007).

Geralmente, plantas resistentes mostram um alto e rápido aumento desse polímero após a infecção de seus tecidos por *F. oxysporum* (DE ASCENSAO; DUBERY, 2000; EL MODAFAR; EL BOUSTANI, 2001; MANDAL; MITRA, 2007). Um reforço da parede celular através da deposição de lignina e polímeros de lignina, precedida pela indução de enzimas como POX, PAL e PPO, pode desempenhar um papel importante na resposta de defesa de plantas contra *F. oxysporum* (MANDAL; MITRA, 2007).

3.5.2.2. Revestimento vascular

Na fase inicial da colonização de pecíolos por patógenos vasculares, plantas podem apresentar dois tipos de material de revestimento nos vasos do xilema, em associação com células do parênquima xilemático que possuem ou não paredes secundárias. Análises histoquímicas mostram que esses revestimentos se assemelham a lignina e suberina (STREET et al., 1986). O revestimento vascular pode ser correlacionado negativamente com a colonização de fungos vasculares. De fato, NEWCOMBE; ROBB (1988) verificaram que as plantas resistentes restringiram a penetração lateral inicial e colonização secundária, as moderadamente resistentes falharam na restrição inicial lateral, mas foram resistentes à colonização secundária, e as susceptíveis não restringiram a colonização secundária de *Verticillium albo-atrum*. Por outro lado, o revestimento da parede celular pode ser ativado em conjunto com um inchaço da parede primária, formação de vários tipos de vesículas e reação de hipersensibilidade nos vasos do xilema de plantas resistentes, como o intuito de limitar a propagação patogênica (RAHMAN et al., 1999).

Esse mecanismo de defesa observado durante a colonização dos vasos do xilema por patógenos vasculares causadores de murcha, indicam que a infusão dos poços da membrana, paredes primárias e células do parênquima com materiais de revestimento poderiam impedir a propagação lateral e vertical desses patógenos (YADETA; THOMMA, 2013). Embora um rápido e eficiente revestimento dos vasos possa ser pré-requisito para o desenvolvimento de um elevado grau de resistência em plantas, de forma isolada não é suficiente para impedir a colonização secundária e o aparecimento de sintomas (NEWCOMBE; ROBB, 1988).

3.5.2.3. Material de oclusão nos vasos do xilema

O material de oclusão é um composto em forma de gel ou goma, depositado em vasos do xilema como resposta a processos normais de envelhecimento, lesões ou ataque de patógenos (RIOUX et al., 1998). Análises bioquímicas e histoquímicas realizadas em várias espécies de plantas infectadas com *F. oxysporum*, mostram que este material de oclusão pode ser rico em substâncias pécticas, lipídicas, fitoalexinas, fenólicos, polissacáridos e compostos de lignina (VANDER MOLEN et al., 1987; BAAYEN, 1988; NIEMANN et al., 1991; SHI et al., 1992; BAAYEN et al., 1996; RIOUX et al., 1998).

Esses géis ou gomas, podem ser originados de duas formas. As gomas podem surgir a partir das placas de perfuração, extremidades das paredes e poços das membranas, por um processo de distensão da parede primária e lamela média (VANDERMOLEN et al., 1987). Por outro lado, microfibrilas de pectina, o componente de base de géis, são transportadas através da camada de proteção, antes de ser segregadas para o interior do elemento de vaso adjacente (RIOUX et al., 1998).

Outra hipótese relacionada à formação de material de oclusão nos vasos do xilema pode implicar a formação de vesículas dentro dos vasos. De fato, citoplasma do parênquima do xilema ao lado de vasos afetados de tecidos resistentes podem conter estruturas em forma de vesículas, especialmente após 7 e 14 dai (BAAYEN, 1988). Produtos de secreção podem revestir as paredes dos vasos e acumular-se nos lúmens dos vasos, em uma variedade de formas de agregados amorfos de vesículas de vários tamanhos e formas (SHI et al., 1992). As vesículas, além de funcionar como inibidores químicos que impedem o crescimento de fungos e afetam a esporulação (SHI et al., 1992), podem formar parte do material de oclusão no interior das células do xilema (BAAYEN; ELGERSMA, 1985).

A maior frequência de vasos ocluídos observados em caules resistentes de feijão infectados com *Fop*, sugere que esse mecanismo pode estar envolvido na resistência do hospedeiro (PEREIRA et al. 2013). O material de oclusão pode criar um ambiente desfavorável para o agente patogênico, onde hifas fúngicas são aparentemente incapazes de proliferar e invadir as paredes dos vasos (OUELLETTE et al., 2002). De fato, compostos químicos acumulados no xilema após a infecção inibem a colonização vertical e lateral de patógenos vasculares (STANGARLIN et al. 2011; YADETA; THOMMA, 2013).

3.5.2.4. Tiloses

Tiloses são projeções do protoplasto de células do parênquima que crescem a partir dos plasmodesmas, ocupando o espaço da seiva no xilema (AGRIOS, 2005; STANGARLIN et al. 2011). A produção de tilose pode ser observada em vasos do xilema de várias plantas, sob condições de estresse ou durante a invasão do xilema por patógenos vasculares (BECKMAN, 1987; AGRIOS, 2005). Com o aparecimento das tiloses, a seiva naturalmente encontra caminho pelos plasmodesmas conectados entre vasos do xilema, mantendo o seu fluxo (STANGARLIN et al., 2011).

Embora esses mecanismos sejam formados durante interações compatíveis e incompatíveis entre hospedeiros e patógenos vasculares causadores de murcha, sua formação espaço-temporal difere significativamente (YADETA; THOMMA, 2013). De fato, tiloses podem ser formadas mais rápida e extensivamente em plantas resistentes quando comparadas às suscetíveis (SHI et al., 1992).

Mecanismos químicos ou outros físicos podem estar associados à formação de tilose. De fato, análises de microscopia eletrônica de transmissão em raízes, mostraram que o xilema desses tecidos pode acumular material de oclusão rico em pectinas perto de tiloses, com a finalidade de fechar completamente alguns vasos do xilema e impedir a propagação do patógeno a outros vasos (RAHMAN et al., 1999). Por outro lado, a formação de tiloses em genótipos resistentes pode ser concomitante ao aumento de lignina (VANDER MOLEN et al., 1987).

4. CAPÍTULO 2 - COLONIZAÇÃO ACROPETAL TARDIA DOS VASOS DO XILEMA ESTÁ ASSOCIADA COM A RESISTÊNCIA DE FEIJÃO COMUM A *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli**

Felipe R. Garcés-Fiallos¹, Marlon C. de Borba¹, Éder C. Schmidt²,
Zenilda L. Bouzon², Marciel J. Stadnik¹

* Artigo publicado no periódico *European Journal of Plant Pathology* (ISSN: 1573-8469), 2017. DOI: 10.1007/s10658-017-1197-6.

¹ Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil.

² Laboratório de Biologia Vegetal Celular, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi comparar a colonização temporal-espacial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) na linhagem resistente UFSC-01 com seu progenitor susceptível cv. Uirapuru. Incidência e severidade de Murcha de Fusarium, descoloração vascular em hipocótilos, unidades formadoras de colônias (cfu) e conteúdo de ergosterol foram quantificados em tecidos da raiz, hipocótilo e epicótilo aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias após inoculação (dai). A colonização fúngica foi também monitorada por microscopia de luz em secções transversais das partes mencionadas bem como da coroa da raiz a 1, 3, 5 e 25 dai. Determinações de cfu e ergosterol conduziram a resultados semelhantes, mostrando que o fungo colonizou mais eficientemente plantas suscetíveis. *Fop* cresceu intercelularmente até alcançar os vasos do xilema das raízes principais. Depois disso, o patógeno começou a colonizar partes superiores pela produção de uma grande quantidade de microconídios dentro dos vasos do xilema. Sintomas precoces e fortes em plantas suscetíveis foram associados a uma rápida colonização e um colapso dos vasos do xilema em tecidos aéreos. Em contraste, vasos de plantas resistentes permaneceram sem ser afetados e o atraso na colonização foi associada com a fraca formação/transporte de conídios em vasos de tecidos da raiz principal e a coroa.

4.1. INTRODUÇÃO

A colonização vascular de plantas resistentes e suscetíveis por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) foi comparada pela primeira vez por BURUCHARA; CAMACHO (2000), registrando que a propagação ascendente do patógeno em caules resistentes foi marcadamente reduzida. De fato, o monitoramento do desenvolvimento de *Fop* por RT-qPCR, sugeriu que a colonização ocorre mais rapidamente em tecidos da raiz e do caule de plantas suscetíveis de feijão (XUE et al., 2012). Também foi demonstrado que uma estirpe altamente virulenta de *Fop* pode atingir mais cedo (isto é, 1,5 dias após inoculação) os vasos do xilema de caules suscetíveis do que uma estirpe fracamente virulenta (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2010). Embora esses estudos tenham indicado que *Fop* exibe uma colonização prejudicada em vasos do xilema de plantas resistentes, há falta de informação sobre como e onde esse atraso ocorre.

Utilizando técnicas de microscopia confocal e RT-qPCR, NIÑO-SÁNCHEZ et al. (2015) demonstraram que isolados de *Fop* com distintos níveis de agressividade colonizam de forma diferente os tecidos radiculares, coroa e hipocótilo de plantas suscetíveis de feijão. Outras técnicas também foram aplicadas com sucesso para quantificar a colonização vascular espacial-temporal por patógenos fúngicos de solo, incluindo microscopia de luz (FANG et al., 2012), quantificação de unidades formadoras de colônias (JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010) e determinação de ergosterol (REMOTTI et al., 1997).

Observações recentes sugerem que a linha UFSC-01 de feijão comum é resistente a Fw. Esse genótipo é resistente à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e possui alto potencial de rendimento (DE FREITAS; STADNIK, 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência a Fw e comparar a colonização vascular espacial-temporal do genótipo UFSC-01 por *Fop* com a do seu cultivar parental suscetível.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) dos genótipos UFSC-01 (linhagem selecionada de uma população segregante do cv. Uirapuru) (DE FREITAS; STADNIK, 2012) e cv. Uirapuru (MODA-CIRINO et al., 2001) foram utilizadas nos experimentos. O isolado monospórico altamente virulento (MANE 174) de *Fop* foi mantido sobre batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C (± 1 °C) e 12 h de fotoperíodo.

Sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo vermiculita como substrato. O sistema radicular de plântulas com as primeiras folhas expandidas (entre 6 e 8 dias depois da semeadura), mantidas em casa de vegetação (26 ± 4 °C, 12 h de luz e intensidade luminosa de $218 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), foram imersas por 20 min em uma suspensão (1×10^6 macroconídios mL^{-1}) de *Fop*. Plântulas cujas raízes foram imersas em água destilada estéril serviram como testemunhas. Depois da inoculação, as plântulas foram imediatamente plantadas em bandejas de polietileno contendo uma mistura de composto orgânico e vermiculita (1:1), e mantidas nas condições anteriormente descritas. O substrato foi irrigado duas vezes por semana com uma solução hidropônica.

A intensidade (incidência e severidade) dos sintomas de murcha de *Fusarium* (MF), assim como a descoloração vascular do hipocótilo e o nanismo causados por *Fop* foram avaliados até os 30 dias após a inoculação (dai). Para a incidência, qualquer sintoma visível de *Mf* em plantas foi registrado. A severidade da doença foi avaliada cada cinco dias de acordo com a escala CIAT (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987). A resistência de cada genótipo foi classificada de acordo com escores, como resistente (1 a 3), intermediário (3,1 a 6) ou susceptível (6,1 a 9) (PASTOR-CORRALES; ABAWI, 1987). A cada cinco dias, os hipocótilos das plantas foram cortados longitudinalmente para avaliar a área da lesão vascular interna. No 30° dai, a altura das plantas foi utilizada para calcular a intensidade do nanismo (%) das plantas infectadas em relação as testemunhas.

Em raízes, hipocótilos e epicótilos coletados aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dai, foram quantificadas as unidades formadoras de colônias (ufc) e o conteúdo de ergosterol. Para a obtenção das ufc, as amostras após serem homogeneizadas em água destilada estéril (1:9 p/v), foi realizada uma diluição seriada. Uma alíquota de 100 μL da diluição 10^{-3} foi colocada em cada placa de Petri contendo PDA (42 g L^{-1}), PCNB (750 mg L^{-1}), oxícloritraticina e estreptomicina (1 g L^{-1}) (NASH; SNYDER, 1962), e finalmente espalhada na placa com uma alça de Drigalski. Após quatro dias a 25 °C (± 1) e fotoperíodo de 12 h, o número de ufc por grama de peso fresco foi calculado. Por outro lado, o ergosterol foi quantificado de acordo com LIU et al. (2013) com modificações, utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode. Ergosterol purificado (ergosta-5,7,22-trien-3-p-ol, Sigma) foi utilizado para construir a curva padrão. Os valores do conteúdo de ergosterol de tecidos de plantas testemunhas foram subtraídos das plantas inoculadas e expressos em conteúdo de ergosterol (μg) por g de peso seco.

A colonização fúngica também foi monitorada por microscopia de luz a 1, 3, 5 e 25 dai. Secções transversais (aproximadamente 5 mm de comprimento) de tecidos da raiz (principal e laterais), coroa, hipocótilo, epicótilo inferior (região entre o cotilédone e segundo nó) e epicótilo superior (região entre o segundo e terceiro nó), foram fixadas em 2,5% paraformaldeído em 0,1 M (pH 7,2) tampão fosfato durante a noite. Em seguida, estas foram desidratadas em uma série crescente de soluções aquosas de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%, SCHMIDT et al., 2009) e infiltradas com historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). As secções (6 secções por cada amostra) de 4 µm foram coradas com azul de toluidina (0,5%), pH 6,8 (Merck Darmstadt, Alemanha) e examinadas com um microscópio de luz (Olympus BX 41) equipado com um software Image Q Capture Pro 5.1 Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA). O número de células infectadas (contendo microconídios no interior) e células ocluídas do xilema foram contadas nas secções transversais dos tecidos da raiz, coroa e hipocótilo aos 5 dai.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma contendo duas plantas. Os experimentos foram repetidos duas vezes independentemente com resultados semelhantes. Após a verificação da homogeneidade das variâncias dos dados, estes foram submetidos à análise de variância. Os testes de t-Student e Wilcoxon-Mann-Whitney ($P \leq 0,05$) foram utilizados para a separação de médias. Quando necessário, a transformação dos dados foi utilizada antes da análise para atender os pressupostos da ANOVA. Relações entre os sintomas de Mf ou a quantidade do patógeno (cfu e conteúdo de ergosterol) e os tempos avaliados foram analisados utilizando a inclinação (r) da regressão linear ($P \leq 0,05$ ou $P \leq 0,01$). A correlação de Pearson foi realizada entre ufc e conteúdo de ergosterol ($P \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism Windows 5.04.

4.3. RESULTADOS

Sintomas da murcha de *Fusarium* (MF) como clorose, desfolha, murcha, descoloração vascular e nanismo foram mais precoces e intensos no cv. Uirapuru. A clorose seguida de murcha nas folhas inferiores foi o primeiro sintoma registrado aos 11 e 23 dai nas plantas dos genótipos Uirapuru e UFSC-01, respectivamente. A MF em algumas plantas do cv. Uirapuru (aproximadamente 30%) evoluiu mais rapidamente causando desfolha intensa aos 30 dai. Em contraste, a maioria das plantas da linhagem UFSC-01 não apresentaram sintomas. De acordo com a escala

CIAT, os genótipos Uirapuru (7.6) e UFSC-01 (1.4) foram classificados como suscetíveis e resistentes a MF, respectivamente. A taxa de sintomas externos e descoloração vascular no hipocótilo foram em média oito vezes maior no cv. Uirapuru do que na linhagem UFSC-01.

As quantificações de ufc e ergosterol mostraram resultados semelhantes respeito ao crescimento fúngico nos tecidos vegetais, mas esta última pareceu ser mais sensível a baixos níveis de colonização. Ambos os métodos foram positivamente correlacionados quando aplicados a partes aéreas de plantas suscetíveis, mas não nas resistentes. Por exemplo, nos epicótilos da linhagem UFSC-01 foi encontrada uma taxa significativa de crescimento fúngico ($r = 0,1$) referente a determinação do ergosterol, mas não foi observada nenhuma alteração nas ufc ao longo do tempo.

As análises microscópicas revelaram que *Fop* cresceu intercelularmente até atingir o xilema do cilindro vascular de raízes resistentes (UFSC-01) mais lentamente do que nas suscetíveis (Uirapuru).

Aos 5 dai, observaram-se microconídios no interior de vasos do xilema de raízes e hipocótilos. Nessas células tanto de tecidos resistentes da raiz e da coroa foram duas vezes menos colonizadas quando comparados aos suscetíveis. Apenas hipocótilos suscetíveis foram infectados (Figura 2.1.). O papel preciso dos microconídios na colonização por *F. oxysporum* é uma questão interessante, pois há relatos controversos envolvendo diferentes espécies hospedeiras. Nossos resultados sugerem que a formação de microconídios dentro do xilema pode facilitar o transporte imediato de fungos para partes superiores de plantas de feijão.

Aos 25 dai, as diferenças na colonização vascular entre as plantas de ambos os genótipos por *Fop* foram mais evidentes (Figura 2.1.). O cilindro vascular de muitas raízes laterais resistentes não foi colonizado, em contraste com as da suscetível onde foram encontradas abundantes conídios e hifas. Vasos do xilema de tecidos aéreos suscetíveis foram colonizados mais fortemente por *Fop* do que os resistentes. Todas as estruturas fúngicas, isto é, conídios, clamidósporos e hifas, foram formadas em vasos de xilema de tecidos aéreos suscetíveis, enquanto que apenas hifas nos resistentes.

Sintomas mais fortes em plantas suscetíveis podem estar associados à maior taxa de colonização de tecidos aéreos ou percentagem de vasos afetados do xilema (Figura 2.1.). Por exemplo, o epicótilo inferior do cv. Uirapuru (162 vasos do xilema) foi mais fortemente colonizado que o do genótipo UFSC-01 (12 vasos do xilema). As paredes

dos vasos do xilema infectado foram danificadas, particularmente nos tecidos aéreos.

Lignina na parede e material de oclusão dentro de vasos do xilema foram observados em todos os tecidos, mas a cor foi mais intensa em tecidos resistentes a partir dos 5 dai. Maior número de vasos ocluídos foi observado em tecidos resistentes infectados aos 25 dai. Finalmente, tiloses ocorreram raramente e somente no epicótilo inferior da linha UFSC-01 aos 25 dai.

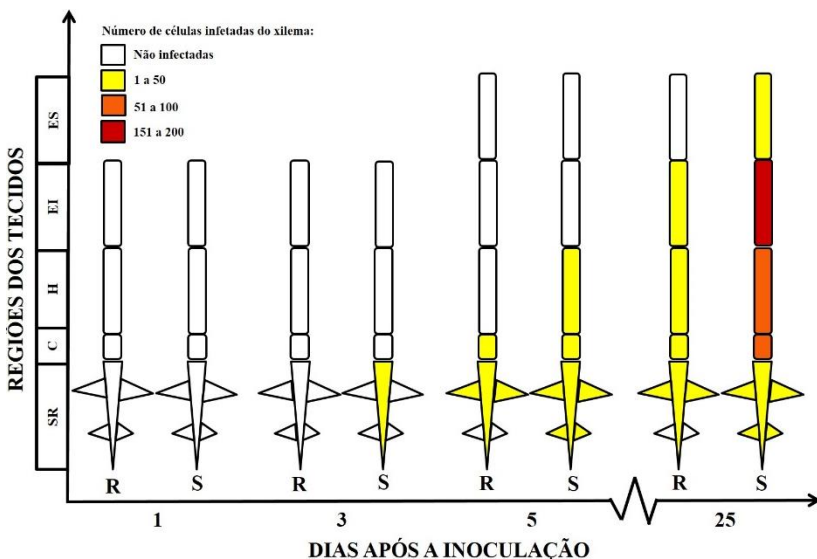


Figura 2.1. Colonização vascular espacial-temporal de plantas de feijão UFSC-01 (R) e Uirapuru (S) a 1, 3, 5 e 25 dias após inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Número de células do xilema infectado em tecidos do sistema radicular (SR: raiz principal e laterais), coroa (C), hipocótilo (H), epicótilo inferior (EI) e epicótilo superior (ES). Amostras (secções de 4 µm) foram coradas com azul de toluidina 0.5%

4.4. CONCLUSÃO

A intensiva e rápida colonização vascular dos tecidos superiores de plantas suscetíveis de feijão por *Fop* resultou em sintomas de doença mais precoces e pronunciados. Em contraste, a colonização ascendente tardia dos vasos do xilema está fortemente associada à resistência do feijoeiro à MF.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BURUCHARA, R. A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 1, p. 39–45, 2000.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 8–13, 2012.

FANG, X. et al. Comparative root colonisation of strawberry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. **Plant and Soil**, v. 358, n. 1, p. 75–89, 2012.

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

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D. et al. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay. **Applied Soil Ecology**, v. 46, n. 3, p. 372–382, 2010.

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

NASH, S. N.; SNYDER, W. C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. **Phytopathology**, v. 52, n. 6, p. 567–572. 1962.

NIÑO-SÁNCHEZ, J. et al. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 234, 2015.

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

REMOTTI, P. C.; LOFFLER, H. J. M.; VLOTEN-DOTING, L. V. Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. **Euphytica**, v. 96, n. 2, p. 237–245, 1997.

SCHMIDT, E. C. et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 860–869, 2009.

VAN SCHOONHOVEN, A.A.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. CIAT: Cali, 1987. 56 p.

XUE, R. F. Et al. Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* detected by real-time quantitative PCR in different common beans cultivars. **Acta Agronomica Sinica**, v. 38, n. 5, p. 791–799, 2012.

5. CAPÍTULO 3 - RESISTÊNCIA DO FEIJOEIRO A *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* ESTÁ ASSOCIADA A PAREDES ESPESSAS E MATERIAL DE OCLUSÃO NOS VASOS DO XILEMA*

Felipe R. Garcés-Fiallos¹, Felipe M. de Quadros¹, Chirle Ferreira², Éder C. Schmidt², Zenilda L. Bouzon², Jorge L. Barcelos-Oliveira³, Marciel J. Stadnik¹

* Artigo submetido ao periódico *European Journal of Plant Pathology* (ISSN: 1573-8469).

¹ Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil.

² Laboratório de Biologia Vegetal Celular, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis, SC, Brasil.

³ Laboratório de Hidroponia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-000 Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar alguns dos mecanismos físicos e químicos de defesa utilizados pelo feijoeiro contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*), na fase inicial da colonização. Sintomas externos e internos foram quantificados nos genótipos resistente UFSC-01 e susceptível Uirapuru. No sistema radicular e hipocótilos desse germoplasma, foi monitorada a atividade das enzimas guaiacol peroxidase (GPX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO) a 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dai. Nesses tecidos, também foi determinado o conteúdo de fenólicos totais, flavonoides e lignina, a 0, 3 e 6 dai. Secções da raiz principal e do hipocótilo foram analisadas com microscópio de epifluorescência a 1, 3 e 6 dai. Nesse último tempo, secções ultrafinas desses tecidos foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão. Uma precoce, maior e rápida atividade das enzimas GPX, PAL e PPO, aliado a uma parede celular espessa dos vasos do xilema, são importantes na defesa de feijão comum a *Fop*. As vesículas, além de inibir quimicamente o crescimento do patógeno, podem formar parte do material de oclusão no interior dos vasos do xilema de plantas resistentes. Em contraste, um aumento de fenólicos em plantas suscetíveis, parece estar associado à posterior destruição do sistema vascular dos seus tecidos.

5.1. INTRODUÇÃO

Patógenos vasculares como *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) para atingir o interior dos vasos do xilema, têm de romper a parede secundária dessas células altamente estruturadas e rígidas (YADETA; THOMMA, 2013). Em raízes de plantas resistentes, existe uma relação entre taxas baixas de colonização e respostas precoces de defesa (ZVIRIN et al., 2010; XUE et al., 2014; 2015). As plantas possuem mecanismos de defesa pré-existentes e induzíveis, bem como respostas imunes. Em relação a estas últimas, nos vasos do xilema podem ocorrer de forma coordenada, respostas físicas (material de oclusão e revestimento vascular) e químicas (vários metabólitos, fitoalexinas, peroxidases e compostos fenólicos), que impedem principalmente que os patógenos se espalhem nessas células e matem ou inibam seu crescimento, respectivamente (YADETA; THOMMA, 2013). Talvez, pela capacidade que possui *Fop* de inicialmente colonizar os vasos do xilema da raiz, e daí alcançar os tecidos superiores (NIÑO-SÁNCHEZ et al., 2015), esses dois mecanismos de resistência podem ser importantes para o feijão comum.

Ainda não foi completamente elucidado como plantas de feijão se defendem de *Fop*. Recentemente, XUE et al. (2015) identificaram em raízes de plântulas resistentes de feijão, vários genes que desempenham um papel importante nas respostas de defesa. Entre esses, alguns que codificam diferentes proteínas cinases, que possuem homologia com proteínas ligadas ou dependentes de cálcio, envolvidas na regulação de hormonas vegetais (ácido jasmônico, auxina, ácido abscísico e ácido salicílico) e um peroxidase secretor (*POX*). A sub-regulação do gene *POX* em raízes infectadas por *Fop*, pode também estar correlacionada tanto com o aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (*PAL*) e guaiacol peroxidase *POX*, assim como com os níveis do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a acumulação do ânion superóxido (O_2^-) (XUE et al. 2014; 2015). Por outro lado, o material de oclusão dentro dos vasos do xilema parece também estar envolvido na resistência do feijão comum (PEREIRA et al., 2013). No entanto, até agora não se sabe como este material pode estar sendo formado.

Embora se conheça que *Fop* coloniza mais lentamente os vasos do xilema (BURUCHARA; CAMACHO, 2000) e que a sua propagação ascendente no caule de plantas de feijão resistentes é marcadamente reduzida (XUE et al., 2015), existe pouca informação sobre os possíveis mecanismos de defesa utilizados pelo hospedeiro contra o patógeno. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar alguns dos mecanismos

físicos e químicos de defesa utilizados pelo feijoeiro contra *Fop*, na fase inicial da colonização.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) dos genótipos UFSC-01 (linhagem selecionada de uma população segregante do cv. Uirapuru) (DE FREITAS; STADNIK, 2012) e cv. Uirapuru (MODA-CIRINO et al., 2001) foram utilizados nos experimentos. O isolado monospórico altamente virulento (MANE 174) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* raça 6 (*Fop6*) foi mantido sobre batata dextrose ágar (BDA) a 25 °C (± 1 °C) e 12 h de fotoperíodo. O isolado foi identificado a nível fisiológico (ALVES-SANTOS et al., 2002a) e molecular (ALVES-SANTOS et al., 2002b), utilizando-se os cultivares diferenciadores e primers A280-B310 de feijão, respectivamente.

Sementes foram semeadas em bandejas de isopor contendo vermiculita como substrato e mantidas em casa de vegetação (26 \pm 4 °C, 12 h de luz e intensidade luminosa de 218 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Após cinco dias, as plântulas foram cuidadosamente removidas das bandejas, transferidas para um sistema hidropônico NFT (Nutrient Film Technique) e mantidas nas mesmas condições ambientais anteriormente citadas, aproximadamente 3 dias até a formação das primeiras folhas expandidas.

O sistema radicular das plântulas foi imerso por 20 min em uma suspensão (1 x 10⁶ macroconídios mL⁻¹) de *Fop6*. Plântulas cujas raízes foram imersas em água destilada estéril serviram como testemunhas. Depois da inoculação, as plântulas foram imediatamente plantadas em bandejas de polietileno contendo uma mistura de composto orgânico e vermiculita (1:1), e mantidas em câmara de crescimento (23 \pm 2 °C e 12 h de luz e intensidade luminosa de 98 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O substrato foi irrigado duas vezes por semana com uma solução hidropônica.

A intensidade (incidência e severidade) dos sintomas de murcha de *Fusarium* (MF), assim como o escurecimento interno de hipocótilo e o nanismo causados por *Fop6* foram avaliados aos 25 dias após a inoculação (dai). A severidade de MF foi avaliada de acordo com a escala do CIAT (VAN SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987). Adicionalmente, a incidência de plantas mortas foi registrada. A porcentagem do escurecimento interno foi estimada mediante o corte longitudinal dos hipocótilos das plantas. A altura da planta foi utilizada para calcular a intensidade do nanismo (%) das plantas infectadas em relação as testemunhas.

A atividade enzimática e o conteúdo proteico foram determinados espectrofotometricamente no sistema radicular e hipocótilos a 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dai, utilizando o leitor de microplacas SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode. Os extratos vegetais foram obtidos segundo JAIN; CHOUDHARY (2014) com modificações, utilizando o tampão (1:4 p/v) fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). O conteúdo de proteína foi determinado de acordo com o método de BRADFORD (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. As atividades das enzimas guaiacol peroxidase (GPX; EC 1.11.1.7), fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.5) e polifenol oxidase (PPO; EC 1.10.3.1) foram determinadas segundo JAIN; CHOUDHARY (2014) com modificações. O aumento da absorbância de GPX e PPO foi determinado a 470 nm durante 3 min a 32 °C e a 395 nm durante 5 min a 35 °C, respectivamente, e expressas em μ katal (1 katal representa a quantidade de enzima que transforma 1 M de substrato s^{-1}). Para a enzima PAL, a conversão de L-fenilalanina em ácido cinâmico foi determinada a 290 nm, utilizando ácido cinâmico comercial (Sigma) como padrão. A atividade de PAL foi expressa em μ g de ácido trans-cinâmico mg de proteína $^{-1}$.

Os fenólicos totais, flavonoides e conteúdo de lignina foram quantificados espectrofotometricamente no sistema radicular e hipocótilos a 0, 3 e 6 dai. Após obter um extrato metanólico (1:10 p/v) a 80%, o homogeneizado foi centrifugado a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido e colocado em gelo até ser utilizado nas análises de fenólicos totais e flavonoides. O sedimento foi armazenado a -80 °C até ser empregado na quantificação do conteúdo de lignina. Os compostos fenólicos foram determinados a partir de uma mistura do extrato metanólico, Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e carbonato de sódio (20%). Após uma hora à temperatura ambiente, a absorbância desta mistura foi determinada a 750 nm. Ácido gálico (Sigma) foi utilizado para construir a curva padrão. Os resultados foram expressos como 1 μ g equivalente de ácido gálico por g de peso fresco. (WATERMAN; MOLE, 1994 com modificações). Os flavonoides foram determinados a partir de uma mistura do extrato metanólico, cloreto de alumínio (2%) e etanol absoluto. Após uma hora à temperatura ambiente, a absorbância desta mistura foi determinada a 420 nm. Quercetina (Sigma) foi utilizada para construir a curva padrão. Os resultados foram expressos como 1 μ g equivalente de quercetina por g de peso fresco (WOISKY; SALATINO, 1998 com modificações). O conteúdo de lignina foi determinado conforme descrito por STADNIK; BUCHENAUER (2000) com modificações, utilizando ácido tioglicólico. O sobrenadante de uma mistura composta por ácido tioglicólico, HCl 2N (v/v) e NaOH 0,5 N, foi

medida a 280 nm. Lignina (alkali, 2-hydroxypropyl ether, Aldrich) foi utilizada para construir a curva padrão. Os resultados foram expressos em mg de lignina por g de peso fresco.

Para as análises de microscopia de epifluorescência (1, 3 e 6 dai) e eletrônica de transmissão (6 dai), amostras da raiz principal e do hipocótilo de aproximadamente 5 mm foram processadas imediatamente após a coleta. Para microscopia de epifluorescência, as amostras fixadas em paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) de um dia para o outro, foram desidratadas em séries crescentes de soluções aquosas de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%, SCHMIDT et al., 2009) e infiltradas com historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Quatro secções transversais de 4 µm por amostra foram analisadas e fotografadas com um microscópio óptico com sistema de epifluorescência (Olympus, modelo BX41, Japão) sob excitação UV (330 nm a 380 nm) e emissão (420 nm). Diferenças entre a autofluorescência dos vasos do xilema de tecidos infectados e não infectados por *Fop6*, foram mensurados para cada genótipo. Para observações sob microscopia eletrônica de transmissão, amostras após serem fixadas durante uma semana em glutaraldeído 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) mais sacarose 0,2 M (SCHMIDT et al., 2009 com modificações), foram fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante quatro horas, desidratadas numa série crescente de uma solução aquosa de acetona e finalmente incorporadas em resina de Spurr. Secções ultrafinas (70 nm) obtidas foram coradas com acetato de uranilo aquoso 1% seguido de citrato de chumbo 1% (REYNOLDS, 1963), e posteriormente examinadas e fotografadas sob TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, a 80 kV).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma contendo duas plantas. Para análise bioquímica e microscópica, seis e duas plantas em cada momento foram amostradas aleatoriamente, respectivamente. Os experimentos foram repetidos duas vezes independentemente com resultados semelhantes. Após a verificação da homogeneidade das variâncias dos conjuntos de dados, estes foram submetidos à análise de variância. Os testes de t-Student ($P \leq 0,05$; $P \leq 0,01$) e Wilcoxon-Mann-Whitney ($P \leq 0,05$) foram utilizados para a separação de médias. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism Windows 5.04.

5.3. RESULTADOS

Os sintomas de MF foram maiores e mais fortes nas plantas do cv. Uirapuru do que nas UFSC-01. Todas as plantas de Uirapuru foram

infectadas, entretanto a incidência da doença nas plantas UFSC-01 foi de 29%. Embora ambos os genótipos apresentaram escurecimento interno do hipocótilo e algum nível de nanismo causado por *Fop6*, esses sintomas foram mais intensos no cv. Uirapuru do que na linhagem UFSC-01.

Nossos resultados mostraram que a ativação das enzimas guaiacol peroxidase (GPX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO), parece ser a primeira resposta de defesa de plantas de feijão comum contra *Fop6* em estágios precoces da colonização (Figura 3.1.). Embora essas respostas foram observadas em plantas infectadas de ambos os genótipos, ocorreu mais rapidamente e em mais tempos avaliados nos tecidos resistentes. Em contraste, a atividade de GPX e PPO foi afetada negativamente por *Fop6* em plantas do cv. Uirapuru. No entanto, a atividade de PAL foi afetada negativamente em ambos os genótipos ao longo do tempo.

De maneira geral, observou-se uma mudança no teor de fenólicos totais, flavonoides e de lignina em ambos os tecidos, a partir dos 3 dai. Os fenólicos totais foram 15% mais elevados unicamente em hipocótilos susceptíveis infectados, em comparação aos não infectados aos 6 dai. Entretanto, o teor dos fenólicos diminuíram 32% em ambos os tecidos infectados de plantas UFSC em comparação aos não infectados aos 3 dai (Figura 3.1.). Os níveis de flavonoides aumentaram 33 e 45% nas raízes (3 dai) e hipocótilos (6 dai) susceptíveis infectados, respectivamente, em comparação aos tecidos não infectados. Em contraste, os flavonoides diminuíram 54% apenas em raízes resistentes infectadas em comparação às não infectadas aos 3 dai (Figura 3.1.). O teor de lignina não foi alterado nos tecidos radiculares de ambos os genótipos ao longo do tempo. No entanto, observou-se uma diminuição de 27 e 53% nesse composto em hipocótilos infectados dos genótipos UFSC e Uirapuru, respectivamente, quando comparados com os tecidos não infectados, aos 3 dai (Figura 3.1.).

Diferenças entre a autofluorescência dos vasos do xilema de tecidos infectados e não infectados por *Fop6*, observaram-se unicamente a partir dos 3 dai (Figura 3.1.). O sistema vascular de tecidos subterrâneos infectados de plantas resistentes foi menos intenso do que os não infectados aos 3 dai. Em contraste, a autofluorescência foi mais intensa em células infectadas de raízes resistentes e hipocótilos susceptíveis, quando comparadas às não infectadas aos 6 dai. Por outro lado, uma desorganização celular foi observada apenas em raízes susceptíveis infectadas nesse tempo.

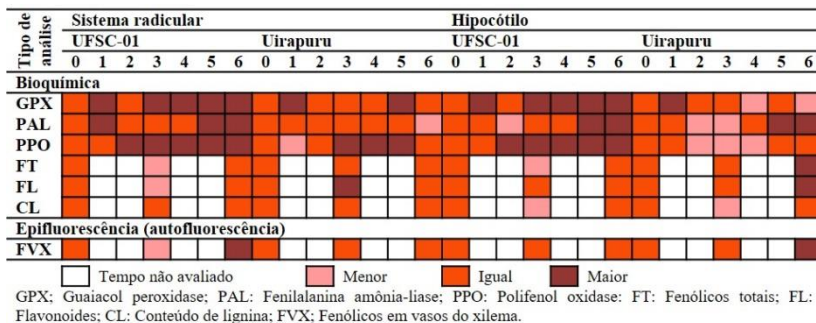


Figura 3.1. Diferenças nas enzimas guaiacol peroxidase (GPX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenol oxidase (PPO), fenólicos totais (FT), flavonoides (FL), conteúdo de lignina (CL) e autofluorescência, entre tecidos ou secções do xilema de raízes e hipocótilos infectados e não infectados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, avaliados entre 0 e 6 dias após inoculação.

A intensidade e a quantidade de xilema ocluído foi maior em raízes e hipocótilos resistentes infectados, comparados com os tecidos suscetíveis infectados e ambos os controles, aos 6 dai.

Embora os vasos infectados ou não por *Fop6* de ambos os genótipos mostraram uma parede celular espessa, essa foi maior em plantas UFSC-01 aos 6 dai. Vesículas adjacentes aos plasmodesmas e a membrana plasmática foram encontradas em tecidos de ambos os genótipos, mas em maior número em tecidos resistentes. Vesículas entre a parede celular e a membrana plasmática foram observadas em vasos de ambos os genótipos. No entanto, essas organelas foram encontradas no citoplasma e fusionando-se com a membrana plasmática somente em tecidos resistentes infectados. Outras organelas como mitocôndrias e complexo de Golgi foram observadas também no citoplasma dos vasos do xilema de ambos os genótipos.

5.4. CONCLUSÃO

Uma maior atividade das enzimas guaiacol peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenol oxidase, aliada a uma parede celular mais espessa dos vasos do xilema, são importantes na defesa de feijão comum resistente a *Fop*. As vesículas, além de inibir quimicamente o crescimento do patógeno, possivelmente contribuem para a formação de parte do material de oclusão no interior dos vasos do xilema de plantas

resistentes. Um aumento de fenólicos em plantas suscetíveis, parece estar associado à posterior destruição do sistema vascular dos seus tecidos.

55. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES-SANTOS, F. M. et al. A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Phytopathology**, v. 92, n. 3, p. 237–244, 2002b.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemist**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BURUCHARA, R. A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 1, p. 39–45, 2000.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 8–13, 2012.

JAIN, S.; CHOUDHARY, D. K. Induced defense-related proteins in soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants by *Carnobacterium* sp. SJ-5 upon challenge inoculation of *Fusarium oxysporum*. **Planta**, v. 239, n. 5, p. 1027–1040, 2014.

MODA-CIRINO, V. et al. IPR88 Uirapuru – common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 205–206, 2001.

NIÑO-SÁNCHEZ, J. et al. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 234, 2015.

PEREIRA, A. C. et al. Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 323–328, 2013.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–212, 1963.

SCHMIDT, E. C. et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 860–869, 2009.

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

VAN SCHOONHOVEN, A.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. CIAT: Cali, 1987. 56 p.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v.37, n.2, p.99–105, 1998.

XUE, R. F. et al. Cloning and characterization of a novel secretory root expressed peroxidase gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Molecular Breeding**, v. 34, n. 3, p. 855–870, 2014.

XUE, R. F. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127698, 2015.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 23, n. 4, p. 97, 2013.

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

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra que o transporte eficiente dos conídios através dos vasos do xilema, permite a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (*Fop*) atingir rapidamente os tecidos superiores das plantas suscetíveis, resultando em sintomas mais precoces e fortes. Os sintomas mais fortes nessas plantas suscetíveis podem ser associados à maior taxa de colonização e dano dos vasos em tecidos aéreos por *Fop*.

Em plantas resistentes, aparentemente existe um atraso na infecção e colonização vascular. Uma maior e mais rápida atividade das enzimas guaiacol peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenol oxidase, aliado a uma parede celular espessa dos vasos do xilema, são importantes na defesa de feijão comum a *Fop*. As vesículas, além de inibir quimicamente o crescimento do patógeno, podem formar parte do material de oclusão no interior dos vasos do xilema de plantas resistentes. Um aumento de fenólicos em plantas suscetíveis, parece estar associado à posterior destruição do sistema vascular dos seus tecidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G. S. Root rots. In: SCHWARTZ, H. F.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Bean production problems in the tropics**. 2. ed. Cali, 1989. p. 105-157.

ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rot of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies**. Cali: CIAT, 1990. 114 p.

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

ALOJ, B. et al. Osservazioni su una nuova razza fisiologica del *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ann. Fac. Sci. Agrar. Univ. Studi Napoli Portici**, v. 4, p. 51–54, 1987.

ALVES-SANTOS, F. M. et al. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3335–3340, 1999.

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

ARDILA H. D.; MARTÍNEZ, S. T.; HIGUERA B. L. Levels of constitutive flavonoid biosynthetic enzymes in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars with differential response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1233–1245, 2013.

BAAYEN, R. P. Responses related to lignification and intravascular periderm formation in carnations resistant to *Fusarium* wilt. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, n. 4, p. 784–792, 1988.

BAAYEN, R. P.; ELGERSMA, D. M. Colonization and histopathology of susceptible and resistant carnation cultivars infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 3, p. 119–135, 1985.

BAAYEN, R. P.; OUELLETTE, G. B.; RIOUX, D. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. **Phytopathology**, v. 86, n. 10, p. 1018–1031, 1996.

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

BELL, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 21–81, 1981.

BIANCHINI, A.; MARRIZONI, A. C.; CAMEIRO, S. N. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo, 2005. v. 2., p. 333-349.

BISHOP, C. D.; COOPER, R. M. An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. **Physiological Plant Pathology**, v. 23, n. 3, p. 323–343, 1983.

BITOCCHI, E. et al. Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 14, p. :E788–96, 2012.

BLAIR, M.W. et al. Diversity and population structure of common bean from Brazil. **Crop Science**, v.53, n. 5, p.1983–1993, 2013.

BURLE, M. L. et al. Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 5, p. 801–813, 2010.

BURUCHARA, R. A.; CAMACHO, L. Common bean reaction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the cause of severe vascular wilt in Central Africa. **Journal of Phytopathology**, v. 148, n. 1, p. 39–45, 2000.

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

COELHO NETTO, R. A.; DHINGRA, O. D. Hospedeiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 156–159, 1999.

COELHO NETTO, R. A.; DHINGRA, O. D. Germinação de clamidósporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* no solo da rizosfera de espécies hospedeiras. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 65–68, 2001.

CHABANET, A. et al. Characterization and localization of a phenoloxidase in mung bean hypocotyl cell walls. **Plant Physiology**, v. 106, n. 3, p. 1095–1102, 1994.

CHANG, P. F. L. et al. Histopathology comparison and phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene expressions in *Fusarium* wilt infected watermelons. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 59, n. 12, p. 1146–1155, 2008.

DE ASCENSAO, A. R.; DUBERY, I. A. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four. **Phytopathology**, v. 90, n. 10, p. 1173–1180, 2000.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 8–13, 2012.

DEBOUCK, D. G. et al. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. **Economic Botany**, v.47, n. 4, p. 408–423, 1993.

DE VECCHI, L.; MATTA, A. An ultrastructural and cytochemical study of peroxidases, polyphenoloxidases and phenols in xylem of tomato plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* or *melonis*. Caryologia: **International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, v. 42, n. 2, p. 103–114, 1989.

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

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

DHINGRA, O. D.; COELHO-NETTO, R. A. Reservoir and non-reservoir hosts of bean-wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, v. 149, n. 7-8, p. 463–467, 2001.

EL MODAFAR, C.; EL BOUSTANI, E. Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 125–130, 2001.

EL MODAFAR, C. et al. Suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity elicited in date palm by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* hyphal wall elicitor. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 4, p. 697–700, 2006.

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

GEPTS, P. A middle American and an Andean common bean pool. In: GEPTS, P. A. **Genetic Resources of Phaseolus Beans**. Dordrecht, 1988. p. 375–390.

GEPTS, P.; BLISS, F. A. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. **Economic Botany**, v. 40, n. 4, p. 469–478, 1986.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: VAN SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. **Research for Crop Improvement**. Wallingfort, 1991. p.7-53.

GEPTS P. et al. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability: I. Americas. **Economic Botany**, v. 42, n. 1, p. 73–85, 1988.

- GEPTS, P. et al. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*); evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v. 40, p. 451–468, 1986.
- GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1-3, p. 131–146, 1997.
- HALL, C.; HEATH, R.; GUEST, D. The infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in Australian cotton. **Australasian Plant Pathology**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2013.
- HENRIQUE, F. H. et al. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 84–92, 2015.
- HERNÁNDEZ-LÓPEZ, V. M. et al. Origen, domesticación y diversificación del frijol común. Avances y perspectivas. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 36, n. 2, p. 95–104, 2013.
- HRUBCOVA, M. et al. Phenolic accumulation and peroxidase activity in in vitro selected alfalfa callus cultures resistant to filtrate of *Fusarium* spp. **Biologia Plantarum**, v. 34, n. 3-4, p. 203–211, 1992.
- JORDAN, C. M.; ENDO, R. M.; JORDAN, L. S. Penetration and colonization of resistant and susceptible *Apium graveolens* by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* race 2: callose as a structural response. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, n. 12, p. 2385–2391, 1988.
- KAPLAN, L.; LYNCH, T. F.; SMITH, C. E. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*) from an intermontane Peruvian valley. **Science**, v. 179, p. 76–77, 1973.
- KAVINO, M. et al. Biochemical markers as a useful tool for the early identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, race 1 resistance banana clones. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 42, n. 11, p. 1069–1078, 2009.
- KENDRICH, J. B.; SNYDER, W. C. Fusarium yellows of beans. **Phytopathology**, v. 32, n. 11, p. 1010–1014, 1942.

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

MACIEL, F. L.; GERALD, L. T. S.; ECHEVERRIGARAY, S. Variation of phaseolin and other soluble proteins among cultivars and landraces of common beans of South-Brazil. **Journal of Genetics and Breeding**, v. 53, p. 149–154, 1999.

MACIEL, F. L.; GERALDL, T. S.; ECHEVERRIGARAY, S. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers variability among cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) of South-Brazil. **Euphytica**, v. 120, n. 2, p. 257–263, 2001.

MACIEL, F. L. et al. Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, n. 8, p. 887–893, 2003.

MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 4-6, p. 201–209, 2007.

MANDAL, S.; MITRA, A.; MALLICK, N. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n. 1-3, p. 56–61, 2008.

MAYER, A. M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? a review. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2318–2331, 2006.

NASCIMENTO, S. R. C.; KUROZAWA, C.; MARINGONI, A. C. Avaliação de raças fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 214–217, 1995.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: Pennsylvania State University, 1983. 193 p.

NIEMANN, G. J.; BAAYEN, R. P.; BOON, J. J. Differentiation between tissues from carnation (*Dianthus caryophyllus*) stems by Pyrolysis-Mass Spectrometry. **Annals of Botany**, v. 65, n. 5, p. 461–472, 1990.

NIEMANN, G. J. et al. Differential response of four carnation cultivars to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* and to *Phialophora cinerescens*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 117–136, 1991.

NIÑO-SÁNCHEZ, J. et al. Gene expression patterns and dynamics of the colonization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by highly virulent and weakly virulent strains of *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 234, 2015.

NEWCOMBE, G.; ROBB, J. The function and relative importance of the vascular coating response in highly resistant, moderately resistant and susceptible alfalfa infected by *Verticillium albo-atrum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 47–58, 1988.

NODARI, R. O. et al. Toward and integrated linkage map of common bean 1. Development of genomic DNA probes and levels of restriction fragment length polymorphism. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 84, n. 1, p. 186–192, 1992.

OUELLETTE, G. B. et al. Reactions of paratracheal cells of resistant and susceptible carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars to vascular invasion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **New Phytologist**, v. 156, n. 1, p. 113–128, 2002.

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

PEREIRA, M. J. Z.; RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 940–947, 2011.

PEREIRA, A.C. et al. Infection process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on resistant, intermediate and susceptible bean cultivars. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 323–328, 2013.

RAHMAN, M. A.; ABDULLAH, H.; VANHAECKE M. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Phytopathology**, v. 147, n. 3, p. 129–140, 1999.

RIBEIRO, R. I. D.; HAGEDORN, D. J. Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Phytopathology**, v. 69, n. 8, p. 859–61, 1979a.

RIBEIRO, R. I. D.; HAGEDORN, D. J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, v. 69, n. 3, p. 272–276, 1979b.

RIOUX, D. et al. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel (gum) and tylosis formation in trees. **Phytopathology**, v. 88, n. 6, p. 494–505, 1998.

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

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

SALGADO, M.O.; SCHWARTZ, H.F.; BRICK, M. A. Inheritance of resistance to a Colorado race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common beans. **Plant Disease**, v. 79, n. 3, p. 279–281, 1995.

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

SCHUETZ, M.; SMITH, R.; ELLIS, B. Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 11–31, 2013.

SHI, J.; MUELLER, W. C.; BECKMAN, C. H. Vessel occlusion and secretory activities of vessel contact cells in resistant or susceptible cotton plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 40, n. 2, p. 133–147, 1992.

SINGH, S. P. et al. Genetic diversity in common bean: II. Marker based analysis of morphological and agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, n. 1, p. 23–29, 1991a.

SINGH, S. P. et al. Genetic diversity in cultivated common bean: II. Marked-based analysis of morphological and Agronomic traits. **Crop Science**, v. 31, n. 1, p. 23–29, 1991b.

SINGH, S. P.; NODARI, R.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean: I. Allozymes. **Crop Science**, v. 31, n. 1, p. 19–23, 1991c.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, 2010.

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

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

STREET, P. F. S.; ROBB, J.; ELLIS, B. E. Secretion of vascular coating components by xylem parenchyma cells of tomatoes infected with *Verticillium albo-atrum*. **Protoplasma**, v. 132, n. 1, p. 1–11, 1986.

TOHME, J. et al. AFLP Analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, v. 36, n. 5, p. 1375–1384, 1995.

VANDER MOLEN, G. E.; BECKMAN, C. H.; RODEHORST, E. The ultrastructure of tylose formation in resistant banana following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 31, n. 2, p. 185–200, 1987.

VELÁSQUEZ-VALLE, R.; SCHWARTZ, H. F. Preliminary evidence on the physiological specialization of a spanish isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* to *Phaseolus vulgaris*. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 16, n. 1, p. 12–17, 1998.

WENDLAND, A. et al. Novas raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* identificadas via detecção específica por PCR. **Summa Phytopathologica**, v. 38(Supl.), p. 249, 2012.

WHITMORE, F. W. Lignin-protein complex catalyzed by peroxidase. **Plant Science Letters**, v. 13, n. 3, p. 241–245, 1978.

WOO, S. L. et al. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs and RAPD. **Phytopathology**, v. 86, n. 9, p. 966–973, 1996.

WORDELL FILHO, J. A.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J.; THEODORO, G. F. Manejo de doenças na cultura do feijão. In: WORDELL, J. A. F.; CHIARADIA, L. A.; BALBINOT, A. **Manejo fitossanitário na cultura do feijão**. Florianópolis, 2013, v. 1, p 9-47.

XUE, R. F. et al. Quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* detected by real-time quantitative PCR in different common beans cultivars. **Acta Agronomica Sinica**, v. 38, n. 5, p. 791–799, 2012.

XUE, R. F. et al. Cloning and characterization of a novel secretory root expressed peroxidase gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Molecular Breeding**, v. 34, n. 3, p. 855–870, 2014.

XUE, R. F. Differentially expressed genes in resistant and susceptible common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127698, 2015.

YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 23, n. 4, p. 97, 2013.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. **Life Sciences**, v. 71, p. 1667-1680, 2002.

ZANOTTI, M. G. S.; QUEIROZ, M. V. DE; DOS SANTOS, J. K.; ROCHA, R. B.; BARROS, E. G. DE; ARAÚJO, E. F. Analysis of genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates, pathogenic and non-pathogenic to common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Phytopathology**, v. 154, p. 545-549, 2006.

ZVIRIN, T.; HERMAN, R.; BROTMAN, Y.; DENISOV, Y.; BELAUSOV, E.; FREEMAN, S.; PERL-TREVES, R. Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1-2. **Plant Pathology**, v. 59, p. 576-585, 2010.