



BRUNO HENRIQUE GARCIA COSTA

**FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DO
FEIJOEIRO CONTRA *Colletotrichum
lindemuthianum* E *Rhizoctonia solani* E NAS
RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA**

LAVRAS - MG

2016

BRUNO HENRIQUE GARCIA COSTA

**FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO CONTRA
Colletotrichum lindemuthianum E *Rhizoctonia solani* E NAS RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS DE DEFESA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Ph. D. Mário Lúcio Vilela de Resende

Orientador

LAVRAS - MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Costa, Bruno Henrique Garcia.

Fosfito de potássio na proteção do feijoeiro contra *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani* e nas respostas bioquímicas de defesa / Bruno Henrique Garcia Costa. – Lavras : UFLA, 2016.
96 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.
Orientador: Mário Lúcio Vilela de Resende.
Bibliografia.

1. Antracnose. 2. Indução de resistência. 3. Atividade enzimática.
4. Tratamento de sementes. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

BRUNO HENRIQUE GARCIA COSTA

**FOSFITO DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO CONTRA
Colletotrichum lindemuthianum E *Rhizoctonia solani* E NAS RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS DE DEFESA**

**POTASSIUM PHOSPHITE FOR THE PROTECTION OF COMMON
BEAN AGAINST *Colletotrichum lindemuthianum* AND *Rhizoctonia solani*
AND THE PLANT BIOCHEMICAL DEFENSE RESPONSES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dr. Hudson Teixeira EPAMIG

Dra. Márcia Rufini UFLA

Dra. Carolina da Silva Siqueira UFLA

Ph. D. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

LAVRAS - MG

2016

*A José Tarcísio, meu pai (in memoriam), que com sua sabedoria, me ensinou a
buscar o conhecimento.*

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e paz em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Moisés, Alexandre, Dario, Joyce, José Diogo, Tharyn, Eliane, Manoel, Marcinho, Deila, Tulio, Lucas, Roberto, Camila, Bruno Marques e, em especial, à pós-doutoranda Ana Cristina, pela contribuição nos experimentos.

Ao professor e orientador Mário Lúcio, pelos ensinamentos e confiança.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite.

À minha mãe, Ana Hercília; ao meu irmão, Cássio e aos demais familiares, pela confiança e carinho.

À minha noiva Etiény, pelo apoio.

A todos que, de certa forma, contribuíram para que mais esta etapa fosse cumprida, obrigado!

RESUMO GERAL

A utilização de fosfitos no manejo de doenças em diferentes cultivos tem aumentado nos últimos anos. Entretanto, são escassos os estudos referentes à utilização desses produtos no controle de doenças no feijoeiro. O objetivo foi verificar o potencial de fosfito de potássio (FP), aplicado na parte aérea e nas sementes, no controle de *Colletotrichum lindemuthianum* e de *Rhizoctonia solani* e elucidar o modo de ação desses produtos em plantas de feijoeiro. O primeiro estudo foi realizado para avaliar fosfitos de potássio em aplicação foliar, no controle da antracnose em casa de vegetação e nas respostas bioquímicas de defesa induzida em feijoeiro. Avaliou-se, também, a detecção de fosfito nos tecidos da planta e a toxidez direta desse produto no crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. Os fosfitos de potássio reduziram a severidade da antracnose e promoveram aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase, além de aumento da lignificação e do teor de compostos fenólicos. Fosfito foi detectado nos tecidos foliares aos sete dias após a aplicação, em concentração que promoveu redução do crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. O segundo estudo foi realizado para avaliar o efeito do tratamento de sementes de feijoeiro com FP no controle de *R. solani* e *C. lindemuthianum*, na indução de respostas bioquímicas de defesa da planta e na compatibilidade com *Rhizobium tropici*, bactéria fixadora de nitrogênio. FP promoveu maior índice de velocidade de emergência e aumento de 40,1% do estande de plantas em relação à testemunha inoculada com *R. solani*. FP proporcionou redução de 56,9% da área abaixo da curva de progresso da antracnose, sendo significativamente semelhante ao tratamento com fungicida. FP aumentou a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, fenilalanina amônia-liase e a lignificação das plantas. A aplicação de FP nas sementes resultou em maior massa de nódulos. O número de nódulos formados, o teor e o acúmulo de nitrogênio foram semelhantes à testemunha inoculada com *R. tropici*. FP promove incremento de compostos de defesa em feijoeiro, o controle de patógenos e é compatível com a inoculação de *R. tropici*. Dessa forma, a aplicação de fosfito é uma técnica promissora para integrar os métodos de manejo de doenças na cultura do feijoeiro.

Palavras-chave: Antracnose. Indução de resistência. Atividade enzimática. Tratamento de sementes.

GENERAL ABSTRACT

The use of phosphites for disease management in different crops has increased in recent years. However, studies regarding the use of these products in controlling diseases of common bean are scarce. The objective of this work was to verify the potential of potassium phosphite (PP), applied to the aerial part of bean common plants and on seeds, for the control of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Rhizoctonia solani*, and elucidate the mode of action of these products. The first study was conducted to evaluate the foliar application of potassium phosphites for the control of anthracnose under greenhouse conditions and the biochemical defense responses induced in common bean plants. We also evaluated the detection of phosphite in the plant tissue and the direct toxicity of this product against mycelial growth of *C. lindemuthianum*. The potassium phosphites reduced the severity of anthracnose and promoted the increase in the activity of enzymes superoxide dismutase, peroxidase, chitinase and β -1,3-glucanase, in addition to increasing lignification and the content of phenolic compounds. Phosphite was detected in the foliar tissues seven days after application, in concentration that promoted the reduction of *C. lindemuthianum* mycelial growth. The second study was conducted to evaluate the effect of the treatment of bean seeds with PP for controlling *R. solani* and *C. lindemuthianum*, in the induction of biochemical defense responses of the plant and compatibility with *Rhizobium tropici*, nitrogen fixing bacterium. PP promoted greater emergence speed index and increase of 40.1% of plant stand in relation to control, inoculated with *R. solani*. PP provided the reduction of 56.9% of the area under the anthracnose progress curve, being significantly similar to the treatment with the fungicide. PP increased the activity of enzymes catalase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and lignification of the leaves. The application of PP to the seeds resulted in higher nodule mass. The number of nodules formed, the content and the accumulation of nitrogen was similar to the control inoculated with *R. tropici*. PP increased the defense compounds and pathogen control, and is compatible with the inoculation of *R. tropici*. Thus, spraying of phosphite is a promising technique for integrating disease management methods for common bean crop.

Keywords: Anthracnose. Resistance induction. Enzymatic activity. Seed treatment.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	A cultura do feijoeiro	13
2.2	Antracnose do feijoeiro	14
2.3	Podridão radicular e tombamento no feijoeiro	16
2.4	Indução de resistência	17
2.5	Fosfitos no manejo de doenças	20
2.6	Nodulação do feijoeiro e tratamento de sementes	23
	REFERÊNCIAS	27
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	35
	ARTIGO 1 - FOSFITOS DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DO FEIJOEIRO CONTRA ANTRACNOSE E NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA	35
1	INTRODUÇÃO	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61
	ARTIGO 2 - FOSFITO NO TRATAMENTO DE SEMENTES DO FEIJOEIRO: CONTROLE de <i>Rhizoctonia solani</i> E <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>, INDUÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA E COMPATIBILIDADE COM BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO	65
1	INTRODUÇÃO	71
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tem importância social e econômica evidenciada pelo enorme contingente de produtores e trabalhadores rurais envolvidos na sua produção (SILVA et al., 2009). Na região Central brasileira, o feijoeiro é cultivado em mais de 85% dos municípios, representando uma importante fonte de renda para os envolvidos na sua cadeia produtiva (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

São diversos os fatores que limitam o potencial produtivo do feijoeiro, dentre os quais, destacam-se os problemas fitossanitários, que provocam extensivas perdas (BARBOSA; GONZAGA, 2012). A antracnose do feijoeiro, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, é uma das mais importantes doenças da cultura. Esse patógeno pode infectar folhas, hastes, vagens e causar perdas de produtividade que chegam a 100% na ausência de medidas de controle (BIGIRIMANA; HOFTE, 2001). O manejo da antracnose pode ser feito por métodos de controle cultural, químico e genético, conduzidos de forma integrada e com caráter preventivo. Dentre essas medidas, a utilização de cultivares resistentes tem sido a forma mais eficaz e econômica de manejo da doença (SARTORATO; RAVA, 1994). Porém, a variabilidade patogênica do fungo, evidenciada pela grande quantidade de raças patogênicas já encontradas, tem dificultado o controle por meio de cultivares com resistência durável (PINTO et al., 2012; SARTORATO; RAVA, 1994). Outro fungo de importância para o feijoeiro, *Rhizoctonia solani* Kuhn, agente causal da podridão radicular e do tombamento de plantas, provoca lesões na parte basal do hipocótilo e na raiz principal das plântulas, acarretando redução do estande e, conseqüentemente, da produtividade (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Como se trata de um patógeno que pode ser transmitido

pela semente, recomenda-se o uso de sementes sadias e ou tratadas com fungicidas. Em áreas infestadas, a rotação com gramíneas propicia a redução do inóculo desse patógeno (MIRANDA; LOBO JÚNIOR; CUNHA, 2007). Diante das dificuldades de controle desses patógenos, buscam-se métodos alternativos para o manejo de doenças (POLANCO et al., 2012).

Segundo Lobato et al. (2008), a utilização de fosfitos pode ser considerada como uma estratégia adicional a ser incluída em programas de manejo de doenças para reduzir o intensivo uso de fungicidas. A utilização desses produtos em diferentes culturas tem aumentado nos últimos anos, devido à eficiência verificada no controle de patógenos (COSTA et al., 2014; DALIO et al., 2012; PEREIRA, V. et al., 2010), evidenciada por dois modos de ação: a toxidez direta contra patógenos, inibindo o crescimento micelial e levando à ruptura das hifas, e ações indiretas, que incluem estímulos dos mais variados mecanismos de defesa das plantas, tanto na ausência, quanto na presença de patógenos (DALIO et al., 2012; ESHRAGHI et al., 2011; LIM et al., 2013). Segundo Lim et al. (2013), a pré-ativação de genes por fosfito antes da infecção ajuda a induzir respostas de defesa de forma antecipada e mais rápida, resultando no aumento dos níveis de resistência. Eshraghi et al. (2011) relataram que fosfito induz a expressão de genes de defesa em plantas de *Arabidopsis thaliana* na ausência do patógeno e que os fitormônios ácido salicílico e ácido jasmônico/etileno estão envolvidos nos mecanismos de defesa induzidos por esse composto, tanto na ausência, quanto na presença do patógeno.

Estudos correlacionam o estímulo de respostas de defesa em plantas principalmente após o tratamento com fosfito na parte aérea. Entretanto, são poucos os trabalhos com a indução de defesa decorrente da aplicação foliar desses produtos em feijoeiro e não existem estudos nessa cultura após o tratamento de sementes com fosfito. Assim, o objetivo foi verificar o potencial de fosfito de potássio (FP) aplicado na parte aérea e, também, nas sementes no

controle de *C. lindemuthianum* e de *R. solani* e elucidar o modo de ação desse produto em plantas de feijoeiro, visando a resistência às doenças causadas pelos patógenos citados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijoeiro

O cultivo do feijoeiro no Brasil é concentrado em três épocas: a primeira safra, também chamada de “safra das águas”; a segunda safra ou “safra da seca”; e a terceira safra, denominada “safra de outono-inverno”. Nesta última, sobretudo na região Central do país, devido ao uso da irrigação e da adoção de tecnologias apropriadas, maiores índices de produtividade têm sido alcançados (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Cultivado no sistema solteiro ou consorciado com outras culturas, o feijoeiro é produzido principalmente nos estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, além de alguns estados do Nordeste e Norte. O sistema de produção é heterogêneo, pois a produção de subsistência convive com a produção altamente tecnificada (SOUZA; WANDER, 2014). O feijoeiro também é uma cultura importante na sucessão de cultivos ao longo do ano, já que pode ser cultivado em período relativamente curto, com ciclo produtivo geralmente em torno de 90 dias (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), considerando o cultivo de feijão em três safras, a área de plantio estimada para a safra 2015/2016 é de 2,82 milhões de hectares, o que configura um decréscimo de 7,1% em relação à safra anterior. A produção nacional deverá ficar em 2,69 milhões de toneladas, 16,3% menor que a última safra, com a produtividade esperada de 1.086 kg ha⁻¹, sendo os cinco principais estados produtores da leguminosa: Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia e Goiás.

Segundo Souza e Wander (2014), há evidências de que a expansão de culturas mais rentáveis, intensivas em tecnologia e com amplo mercado internacional tem substituído áreas de outras culturas, entre elas, o feijão. Em contrapartida, destaca-se o importante papel da tecnologia, associada ao melhoramento de cultivares de feijoeiro e a melhores processos produtivos, uma

vez que, a produtividade tem incrementado o valor da produção de feijão e abrandado o efeito substituição do feijoeiro por outras culturas.

O feijoeiro é cultivado durante todo o ano numa grande diversidade de ecossistemas, situação que expõe as plantas a muitos fatores que lhes são desfavoráveis. Entre eles, destacam-se as doenças. Essa leguminosa é hospedeira de diversos patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides. A importância de cada doença varia segundo o ano, a época, o local e a cultivar utilizada. As perdas anuais decorrentes por doenças são, geralmente, significativas, o que justifica a adoção de medidas de controle (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

2.2 Antracnose do feijoeiro

A antracnose, causada pelo fungo ascomiceto *C. lindemuthianum*, tem uma distribuição mundial, mas é particularmente problemática em regiões temperadas. O ataque deste fungo ocorre em todos os estádios de desenvolvimento do feijoeiro e pode resultar em desfolha precoce, queda prematura de flores e vagens, deterioração das sementes e, em casos extremos, morte da planta, podendo causar perdas de até 100% em condições favoráveis ao patógeno (BIGIRIMANA; HOFTE, 2001; CAMPA et al., 2014; POLANCO et al., 2012).

O fungo *C. lindemuthianum* é hemibiotrófico, ou seja, comporta-se como biotrófico no início da fase de infecção, passando a necrotrófico nas fases finais da colonização do tecido do hospedeiro (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Os sintomas típicos desta doença são lesões necróticas de coloração marrom-escura nas nervuras na face inferior da folha. As lesões podem ser vistas, também, na face superior das folhas, quando uma região clorótica se desenvolve ao lado das manchas necróticas e as folhas tendem a curvar-se para baixo. Em ataques severos, as lesões estendem-se no limbo foliar

ao redor das áreas afetadas nas nervuras, resultando em necrose de parte do tecido foliar. Lesões produzidas no caule e nos pecíolos são alongadas e escuras. Nas vagens, são geralmente circulares e deprimidas, de coloração marrom, com os bordos escuros e salientes, circundados por um anel pardo-avermelhado. A doença é favorecida por temperaturas entre 13 e 27 °C, com ótimo a 20 °C, associada à alta umidade relativa do ar. Os conídios germinam em 6 a 9h sob condições favoráveis, formam tubo germinativo, apressório e penetram mecanicamente pela cutícula do hospedeiro. O aparecimento dos sintomas ocorre a partir de seis dias após o início da infecção (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). No Brasil, a doença ocorre na maioria dos estados produtores, sobretudo em Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (VIEIRA, 2005).

A disseminação do patógeno ocorre a longas distâncias, por meio de sementes contaminadas, ou, a curtas distâncias, por respingos de chuva, insetos, animais, restos culturais e por implementos agrícolas que entram em contato com plantas infectadas. Os esporos são levados a outras plantas, principalmente, pela ação de gotículas de chuva ou irrigação da lavoura. O fungo pode permanecer nos restos de cultura por até dois anos (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

As estratégias de manejo da antracnose incluem o uso de sementes saudáveis, o controle químico e o desenvolvimento de cultivares resistentes (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Contudo, a variabilidade patogênica do fungo, evidenciada pela grande quantidade de raças patogênicas já encontradas, tem dificultado o controle da doença por meio de cultivares com resistência durável (PEREIRA, R. et al., 2010). A aplicação de fungicidas é amplamente utilizada por agricultores para controlar a antracnose, apesar do potencial negativo de impacto ambiental e da possível seleção de resistência do agente patogênico aos fungicidas (HALL, 1991).

2.3 Podridão radicular e tombamento no feijoeiro

A podridão radicular e o tombamento são doenças causadas por *R. solani*, comuns na América Latina e em outras regiões do mundo. São doenças economicamente importantes, pois são responsáveis pela redução da população de plantas e, conseqüentemente, da produção (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

A fase sexuada de *R. solani* corresponde ao basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris*. O fungo se caracteriza por apresentar um micélio septado, de coloração variável, de branco a marrom, com ramificações em ângulo reto e com frequentes constrições na região dos septos. Sua sobrevivência de uma estação de cultivo para outra ocorre em restos de cultura, uma vez que o fungo tem grande capacidade saprofítica e, também, ocorre a sobrevivência por meio de escleródios. O fungo possui um grande número de plantas hospedeiras e pode ser disseminado pela semente, transporte de solo, restos de cultura infestados, água de irrigação, chuva e implementos agrícolas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Os primeiros sintomas da podridão de *R. solani* são caracterizados pela maceração de tecidos do sistema radicular, sendo que esse estágio dificilmente é observado no campo, devido à rapidez do processo, que ocorre quase concomitantemente à emergência. Posteriormente, são formadas lesões necróticas de coloração pardo-avermelhada, com bordos definidos, que eventualmente se coalescem e constituem o sintoma típico da podridão radicular de *R. solani* (MIRANDA; LOBO JÚNIOR; CUNHA, 2007). A infecção durante a emergência causa o anelamento das plântulas, levando ao tombamento ou “damping-off” de pré e pós-emergência. Plântulas são altamente suscetíveis ao patógeno e plantas em estágio mais desenvolvido são menos afetadas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; TOLEDO-SOUSA et al., 2009). Esses efeitos levam à redução do estande e do vigor das plântulas e

consequente, redução da produtividade da cultura (TOLEDO-SOUSA et al., 2009).

Para o controle do patógeno, que pode ser transmitido pela semente, recomenda-se o uso de sementes certificadas e livres de patógenos e insetos-praga. Em áreas infestadas, a rotação com gramíneas propicia a redução do inóculo (MIRANDA; LOBO JÚNIOR; CUNHA, 2007). Sugere-se evitar semeadura profunda, pois aumenta o tempo de emergência e prolonga a exposição de tecidos suscetíveis ao patógeno (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). O tratamento de sementes com fungicidas, também, é recomendado, uma vez que, é uma tecnologia amplamente difundida e visa eliminar os fungos veiculados pela semente e protegê-las dos que estão presentes no solo, garantindo o estabelecimento ideal da população de plantas, o que é essencial para o sucesso do cultivo (BARROS; FURLAN, 2008).

2.4 Indução de resistência

Para se defender contra uma vasta gama de patógenos como vírus, bactérias, fungos e nematoides em seu ambiente, as plantas são equipadas com barreiras mecânicas e químicas constitutivas e de sistemas de defesa induzíveis (MONTESANO; BRADER; PALVA, 2003). A indução de resistência sistêmica ou resistência sistêmica adquirida foi conceituada como sendo a ativação de um estado de resistência contra doenças, induzido sistemicamente em plantas pela infecção localizada por fitopatógenos, ou, em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos e abióticos (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Os indutores de resistência atuam como moléculas sinalizadoras de respostas de defesa. Ao serem reconhecidos pelas células vegetais, induzem a expressão de genes que codificam a síntese de compostos de defesa, impedindo ou dificultando o estabelecimento e ou o desenvolvimento do patógeno

(MÉTRAUX, 2001). Dessa maneira, as plantas são capazes de resistir a um ataque de um potencial patógeno, quando previamente tratadas com indutores de respostas de defesa, reagindo com a indução de uma sucessão de defesas que impedem a infecção (MONTESANO; BRADER; PALVA, 2003). A resistência resultante tende a ser de amplo espectro e pode ser de longa duração, mas raramente é completa, com a maioria dos agentes indutores reduzindo a doença entre 20 e 85% (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

A indução de resistência pode levar à ativação direta de defesas, mas também ao efeito *priming* das células, resultando em mais rápida e forte indução das defesas após o ataque de agentes patogênicos (GOELLNER; CONRATH, 2008). Segundo Ahmad et al. (2010), os fenômenos de resistência induzida são baseados em uma combinação de indução direta de defesa e *priming* (pré-condicionamento).

Geralmente, a indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) (VIDHYASEKARAN, 1988). As PRPs abrangem famílias de proteínas com estruturas e funções variadas (quitinases, β -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases, osmotinas, dentre outras), mas todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese, apresentando dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção de plantas (LOON; STRIEN, 1999). As PRPs se acumulam rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou, também, em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse (LOON; REP; PIETERSE, 2006). PRPs associadas à resistência sistêmica adquirida foram detectadas em muitas plantas, como por exemplo, em fumo (PAN; YE; KUC, 1991), tomate (BENHAMOU; LAFONTAINE; NICOLE, 1994) e feijão (DANN et al., 1996). As PRPs β -1,3-glucanases e quitinases catalisam a hidrólise de β -1,3-glucana e quitina, respectivamente, componentes principais das paredes celulares de muitos fungos, podendo assim,

apresentar atividade antimicrobiana (STANGARLIN; PASCHOLATI, 2000; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997).

As respostas de defesa têm sido associadas, também, aos produtos da rota dos fenilpropanoides. A fenilalanina amônia-liase é uma importante enzima dessa rota, que leva à formação de lignina e compostos fenólicos (RAES et al., 2003). Metabólitos secundários como os compostos fenólicos são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção, estando assim, envolvidos na defesa da planta contra o ataque de patógenos. São exemplos de compostos fenólicos o ácido clorogênico, o catecol e os flavonoides (CAMPOS et al., 2004). A lignina pode desempenhar um papel importante na resistência por meio de diferentes mecanismos, como por exemplo, no estabelecimento de barreiras mecânicas ao avanço e ao crescimento do patógeno; na modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque por enzimas hidrolíticas secretadas pelos patógenos e no aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas por patógenos e impedindo que nutrientes do tecido hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001). A lignina é formada pela polimerização de precursores produzidos na rota dos fenilpropanoides, sendo iniciada pela desaminação da fenilalanina para ácido cinâmico e catalizada pela enzima fenilalanina amônia-liase (STICHER; MAUCHI-MANI; MÉTRAUX, 1997).

Plantas sob estresse, geralmente, usam um complexo sistema de defesa constituído por um diversificado leque de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, glutaciona-redutase e ascorbato peroxidase. Estas enzimas são utilizadas para estabilizar as espécies ativas de oxigênio e proteger as células dos danos oxidativos (HOSSAIN; UDDIN, 2011; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). As peroxidases podem atuar tanto diretamente na defesa de plantas a patógenos, quanto nas vias de sinalização relacionadas a diversos processos fisiológicos em plantas, inclusive na resposta

de defesa (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011). Já as catalases são enzimas que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo as principais enzimas de detoxificação desse composto nas plantas (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Em estudo com feijoeiros resistentes e suscetíveis ao mofo branco, Leite et al. (2014) verificaram que a linhagem com o maior nível de resistência ao mofo branco se destacou com a maior atividade da peroxidase, sinalizando a participação dessa enzima na resistência do feijoeiro. O genótipo resistente, também, apresentou atividade superior da enzima superóxido dismutase. Já Campos et al. (2004) observaram que cultivares de feijoeiro mais resistentes à antracnose apresentaram maior atividade da peroxidase e também o maior acúmulo de compostos fenólicos.

Segundo Burra et al. (2014), plantas tratadas com agentes indutores de resistência como ácido β -aminobutírico (BABA), tiamina (vitamina B1), acibenzolar-S-methyl (ASM) e fosfito (H_2PO_3^-) apresentaram maior resistência após o ataque de patógenos. Estudos moleculares recentes indicam a ativação de uma ampla gama de respostas de defesa durante a resistência induzida por esses compostos.

2.5 Fosfitos no manejo de doenças

O fósforo é um dos principais nutrientes requeridos para o desenvolvimento das plantas. Esse elemento não ocorre naturalmente de forma livre devido à sua alta reatividade, combinando-se rapidamente com outros elementos, como o oxigênio e o hidrogênio. O ânion fosfato (HPO_4^{2-}) é a principal forma de fósforo utilizada pelas plantas para sua nutrição. Já os fosfitos (H_2PO_3^-), que são sais do ácido fosforoso, diferem do fosfato pela substituição de um átomo de oxigênio por um de hidrogênio em sua molécula. Esta substituição resulta em diferenças profundas na forma em que os dois compostos se comportam em organismos vivos. Devido às suas similaridades estruturais,

fosfito é considerado análogo ao fosfato, entretanto fosfito não é incorporado a compostos orgânicos e assim, se acumula nos tecidos, pois este composto não pode ser reduzido a fosfato dentro da planta (DALIO et al., 2012; GUEST; GRANT, 1991; MCDONALD; GRANT; PLAXTON, 2001). Dessa maneira, a utilização de fosfitos na agricultura tem sido investigada principalmente no que diz respeito aos seus efeitos no controle de doenças (DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010).

Estudos relatam que os fosfitos exercem um complexo modo de ação contra fungos e oomicetos, que envolvem ação direta, por meio da inibição da esporulação ou redução da taxa de crescimento, e efeitos indiretos, com uma rápida e forte estimulação de mecanismos de defesa da planta, tanto na presença quanto na ausência do patógeno (DALIO et al., 2012; DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010; ESHRAGHI et al., 2011; LIM et al., 2013). Na cultura do cafeeiro, Ogoshi et al. (2013) verificaram que fosfito de potássio proporcionou redução de 62,5% da severidade da antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Os autores ainda observaram que o fosfito inibiu a germinação de conídios, a formação do apressório e o crescimento micelial do fungo. Também estudando fosfito no controle de patógenos da cultura do cafeeiro, Costa et al. (2014) verificaram efeito tóxico desse produto na germinação de urediniósporos de *Hemileia vastatrix* e também na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Cercospora coffeicola*. Silva et al. (2015), em estudo utilizando microscopia eletrônica, observaram que fosfito de potássio reduziu o crescimento micelial e a emissão do tubo germinativo de *C. lindemuthianum*, agente etiológico da antracnose do feijoeiro.

Na indução de resistência em plantas, Eshraghi et al. (2011) verificaram a indução da expressão de genes de defesa em resposta ao tratamento com fosfito em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Os autores, também, observaram que os fitormônios ácido salicílico e ácido jasmônico/etileno estão envolvidos nos

mecanismos de defesa induzidos por fosfito, tanto na ausência, quanto na presença do patógeno, sugerindo que o tratamento com esse composto poderia permitir o recrutamento de moléculas que participam de diferentes rotas de resposta de defesa contra patógenos, tanto biotróficos, quanto necrotróficos. Lim et al. (2013), estudando o patossistema *Solanum tuberosum* L. - *Phytophthora infestans*, verificaram o aumento da expressão de proteínas associadas à defesa de plantas após o tratamento com fosfito e sugeriram que a pré-ativação dessas proteínas em plantas tratadas com fosfito antes da infecção, contribui para o aumento dos níveis de resistência do hospedeiro. Nesse estudo, também, foi verificada a indução de resposta de hipersensibilidade e a formação de calose após o ataque do patógeno em folhas tratadas com fosfito.

Os fosfitos têm promovido uma eficiente proteção contra doenças em diversos patossistemas (BURRA et al., 2014). Em feijoeiro, Silva et al. (2015) verificaram em casa-de-vegetação que fosfito de potássio reduziu em 60,4% a severidade da antracnose. Além disso, fosfito de potássio aumentou a atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase em plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno. Efeito positivo de fosfito de potássio, também, foi observado para a redução da incidência e da severidade da brusone do trigo, com 36% e 56% de controle, respectivamente, em comparação com plantas não tratadas (PAGANI; DIANESE; CAFÉ-FILHO, 2014). Nojosa et al. (2009) observaram redução da severidade da mancha-de-Phoma em mudas de café pulverizadas com fosfito de potássio, assemelhando-se ao controle proporcionado pelo fungicida padrão. Fosfito de zinco foi uma alternativa eficiente no controle do oídio em minicepas de eucalipto, com aproximadamente 56% de redução da doença (SILVA et al., 2016).

Uma estratégia inovadora no âmbito da gestão integrada das culturas é a utilização de compostos químicos biocompatíveis que melhorem o controle de doenças em plantas por meio da indução de resistência. Dentre esses, os fosfitos

têm recebido uma atenção especial, pois têm sido capazes de controlar doenças causadas por oomicetos e fungos, por meio da ação direta sobre os patógenos e um efeito indireto, pela estimulação de respostas de defesa no hospedeiro (DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010; MACHINANDIARENA et al., 2012). Além da aplicação isolada, a associação de fosfito com fungicidas tem sido uma alternativa eficaz no manejo de doenças, em virtude de proporcionar efeito aditivo ou sinérgico (NEVES, 2006).

São poucos os trabalhos com indução de defesas no feijoeiro decorrente da aplicação foliar de fosfito de potássio e não existem estudos após o tratamento de sementes com o produto. Pesquisas com aplicação de fosfito de potássio na parte aérea e nas sementes são necessárias para verificar o controle de patógenos por fosfito de potássio no feijoeiro e, também, para obter informações sobre a indução de compostos de defesa, como proteínas relacionadas à patogênese, compostos fenólicos e lignina e, com isso, compreender o modo de ação desse produto.

2.6 Nodulação do feijoeiro e tratamento de sementes

O feijoeiro desenvolve associação simbiótica eficiente nas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium*. Quando a bactéria está presente no solo, naturalmente ou via inoculação, ela reconhece e coloniza as raízes da planta hospedeira, provocando a formação do nódulo. Após a iniciação do nódulo, o *Rhizobium* diferencia-se em bacteroide, que se multiplica e começa a sintetizar a nitrogenase, complexo enzimático responsável pela redução do nitrogênio atmosférico à amônia, iniciando-se a fixação biológica do nitrogênio (HUNGRIA et al., 2001). Em troca, a planta supre a bactéria com fontes de energia e carbono para sua manutenção (MERCANTE; GOI; FRANCO, 2002).

Embora as bactérias possam estar naturalmente presentes no solo, estão contidas também em inoculantes biológicos que são colocados em contato com

as sementes pelo processo de inoculação. Isto possibilita que, após a germinação e desenvolvimento da plântula, ocorra a infecção e a formação de nódulos nas raízes, por onde as plantas obtêm o N para o seu desenvolvimento (VIEIRA NETO et al., 2008). Muitas vezes, nas sementes, juntamente com a aplicação de inoculantes, tem sido utilizados fungicidas para o controle de patógenos. Entretanto, o tratamento das sementes com fungicidas coloca esses compostos químicos em contato direto com o inoculante, fato que pode ser prejudicial à sobrevivência da bactéria e à fixação biológica de nitrogênio. O tratamento de sementes com fungicidas pode reduzir o número de células viáveis de rizóbios, a eficiência da inoculação aplicada via semente e a fixação simbiótica de nitrogênio no feijoeiro (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Segundo Alcântara Neto et al. (2014), normalmente a aplicação de fungicidas tem sido realizada antes da inoculação para diminuir os efeitos tóxicos sobre as bactérias fixadoras de nitrogênio. Entretanto, ainda ocorrem incompatibilidades dos microrganismos simbiotes com alguns fungicidas, sugerindo a necessidade de encontrar técnicas de utilização destes produtos no tratamento de sementes sem comprometer a sobrevivência da bactéria e, conseqüentemente, a nodulação (ARAÚJO; ARAÚJO, 2006). Os benefícios promovidos pelo uso do tratamento de sementes têm estimulado cada vez mais sua adoção pelos agricultores. Entretanto, são escassos os estudos referentes à compatibilidade de produtos alternativos, como os fosfitos, com a nodulação de plantas. Espindola (2015) verificou que uma formulação de fosfito de manganês não prejudicou a simbiose entre a planta e bactérias fixadoras de nitrogênio na cultura da soja. Segundo esse autor, o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento de sementes deve objetivar além de seu efeito principal, obter características secundárias que no mínimo não prejudiquem a viabilidade de outras modalidades de tratamento de sementes também utilizadas e não promovam efeitos negativos à germinação, ao crescimento e ao desenvolvimento

das plantas. Assim, pesquisas para compreender a ação dos fosfitos no controle de doenças e na interação com bactérias fixadoras de nitrogênio nas sementes são necessárias.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. et al. Natural variation in priming of basal resistance: from evolutionary origin to agricultural exploitation. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 11, p. 817-827, Nov. 2010.
- ALCÂNTARA NETO, F. et al. Tempo de contato e de combinações de fungicidas, aditivo e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. **Revista Agro@ambiente On-line**, Boa Vista, v. 8, n. 1, p. 149-154, jan./abr. 2014.
- ARAÚJO, A. S. F.; ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 973-976, jun. 2006.
- BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2012. 247 p. (Documentos, 272).
- BARROS, B. C.; FURLAN, S. H. Efeito do tratamento fungicida e da profundidade de semeadura no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 499-505, out./dez. 2008.
- BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P. J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance of *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1432-1444, set. 1994.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H. L. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 333-349.
- BIGIRIMANA, J.; HOFTE, M. Bean Anthracnose: inoculation methods and influence of plant stage on resistance of *Phaseolus vulgaris* cultivars. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 403-408, Aug. 2001.
- BURRA, D. D. et al. Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. **BioMed Central Plant Biology**, London, v. 14, p. 254, Oct. 2014.

CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 14, p. 115, Apr. 2014.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 7, p. 637-643, jul. 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos, sétimo levantamento, abril/2016**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_07_10_39_11_boletim_graos_abril_2016.pdf>. Acesso em: 8 ago. 2016.

COSTA, B. H. G. et al. Suppression of rust and brown eye spot diseases on *Coffee* by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 162, p. 635-642, Jan. 2014.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DANN, E. K. et al. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and β -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, n. 5, p. 307-319, 1996.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Newport, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, May 2010.

ESHRAHGI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 60, p. 1086-1095, May 2011.

ESPINDOLA, D. L. P. **Tratamento de sementes com fosfito de manganês e enxofre**: efeitos na soja e no desenvolvimento de fitopatógenos. 2015. 51 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, p. 233-242, May 2008.

GUEST, D.; GRANT, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 66, p. 159-187, May 1991.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: APS, 1991. 31 p.

HOSSAIN, M. A.; UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1094-1101, 2011.

HUNGRIA, M. et al. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: EMBRAPA-Soja, 2001. 48 p.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 199-208, May 2001.

LEITE, M. E. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, p. 391-404, Feb. 2014.

LIM, S. et al. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. **Journal of Proteomics**, New York, v. 93, p. 207-223, Mar. 2013.

LOBATO, M. C. et al. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, p. 349-358, Nov. 2008.

LOON, L. C. van; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-62, 2006.

LOON, L. C. van; STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physical and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 3, p. 85-97, Aug. 1999.

MACHINANDIARENA, M. F. et al. Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology, Stuttgart**, v. 169, p. 1417-1424, Sept. 2012.

MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 24, p. 1505-1519, 2001.

MERCANTE, F. A.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies de leguminosa e rizóbio. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, Rio de Janeiro, v. 22, p. 65-81, 2002.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 13-18, Nov. 2001.

MIRANDA, B. A.; LOBO JÚNIOR, M.; CUNHA, M. G. Reação de cultivares do feijoeiro comum às podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, p. 221-226, dez. 2007.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, E. T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 73-79, Jan. 2003.

NEVES, J. S. **Influência da aplicação de fosfito de potássio na severidade da ferrugem asiática da soja**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha-de-Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 1, p. 60-62, jan./fev. 2009.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Paseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 27, n. 1, p. 75-98, July 1985.

OGOSHI, C. et al. Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants.

Bioscience Journal, Uberlândia, v. 29, p. 1558-1565, Nov. 2013.

PAGANI, A. P. S.; DIANESE, A. C.; CAFÉ-FILHO, A. C. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 42, p. 609-617, Dec. 2014.

PAN, S. Q.; YE, X. S.; KUC, J. Association of β -1,3- glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 25-39, July 1991.

PEREIRA, R. et al. Occurrence of anthracnose in common bean cultivars collected in the state of Minas Gerais, Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 53, p. 224-225, 2010.

PEREIRA, V. F. et al. Produtos alternativos na proteção da videira contra o míldio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 1, p. 25-31, jan. 2010.

PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 5, p. 490-497, May 2012.

PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 241-248, abr./jun. 2011.

POLANCO, L. R. et al. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 161, p. 140-150, July 2012.

RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, Nov. 2003.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 1, p. 123-130, jan./fev. 2003.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Antracnose. In: _____. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1994. p. 41-68.

SILVA, A. C. et al. Plant extract, zinc phosphite and zinc sulphate in the control of powdery mildew in the eucalyptus. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, p. 93-100, jun./mar. 2016.

SILVA, E. F. et al. Inoculação de feijoeiro com *Rhizobium tropici* associada à exsudato de *Mimosa flocculosa* com diferentes doses de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 2, p. 443-451, 2009.

SILVA, J. L. et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, p. 243-253, Feb. 2015.

SOUZA, R. da S.; WANDER, A. E. Aspectos econômicos da produção de feijão no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, DF, v. 23, n. 3, p. 43-54, jul./ago. 2014.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus*. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 26, n. 1, p. 34-42, 2000.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Sistemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270, 1997.

TOLÊDO-SOUZA, E. D. et al. Interações entre *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 1, p. 13-17, jan./mar. 2009.

VIDHYASEKARAN, P. Lignin and disease resistance. In: _____. **Physiology of disease resistance in plants**. Boca raton: CRC, 1988. v. 2, p. 121-135.

VIEIRA, C. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2005. p. 301-392.

VIEIRA NETO, S. A. et al. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, p. 861-870, abr. 2008.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, Feb. 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 - FOSFITOS DE POTÁSSIO NA PROTEÇÃO DO
FEIJOEIRO CONTRA ANTRACNOSE E NAS RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS DE DEFESA**

Bruno Henrique Garcia Costa⁽¹⁾, Mário Lúcio Vilela de Resende⁽¹⁾, Ana Cristina Andrade Monteiro⁽¹⁾, Pedro Martins Ribeiro Júnior⁽²⁾, Deila Magna dos Santos Botelho⁽¹⁾ e Bruno Marques da Silva⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Campus UFLA, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. ⁽²⁾Embrapa Semiárido, Rodovia BR-428, Km 152, s/n - Zona Rural, Petrolina - PE, Caixa Postal 23, CEP 56302-970. E-mail: brunohenriquegc@yahoo.com.br, mlucio@dfp.ufla.br, monteiroaca@yahoo.com.br, pedro.ribeiro@embrapa.br, deila.magna@hotmail.com, brunomsufla@gmail.com

ARTIGO REDIGIDO CONFORME A NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

Objetivou-se neste estudo verificar o efeito de fosfitos de potássio no controle da antracnose e o modo de ação destes produtos em feijoeiro contra *Colletotrichum lindemuthianum*. A proteção do feijoeiro contra a antracnose foi avaliada em casa de vegetação, onde plantas foram pulverizadas com os tratamentos: fosfitos de potássio (Fosfito A e B a 5,0 mL L⁻¹), ASM (0,25 g L⁻¹) e um tratamento controle (não pulverizado). Foram realizadas duas pulverizações, nos estádios V4 e R5, e a inoculação com *C. lindemuthianum* foi realizada cinco dias após a primeira pulverização. As formulações de fosfitos reduziram a severidade da antracnose em 68,7% e 55,6%. Foi conduzido outro ensaio para a detecção de fosfito nos feijoeiros, sendo verificado que a concentração de fosfito ficou entre 1 e 3 mM nos tecidos foliares sete dias após a aplicação. Essas concentrações em teste *in vitro* promoveram inibição de 15,0 a 25,7% do crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. As atividades de enzimas relacionadas à defesa de plantas contra patógenos e os teores de compostos fenólicos e lignina foram avaliadas. Os fosfitos promoveram o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase, além de aumento da lignificação e do teor de compostos fenólicos. Fosfito promove o controle da antracnose por ação direta sobre *C. lindemuthianum* e por indução de compostos bioquímicos de defesa.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* (L.). *Colletotrichum lindemuthianum*. Indução de Resistência.

**Phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose
and in the induced biochemical defense responses**

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effect of potassium phosphites for controlling anthracnose and the mode of action of these products on common bean plants against *Colletotrichum lindemuthianum*. The protection of common bean plants against anthracnose was evaluated in greenhouse, where plants were pulverized with treatments: potassium phosphite (Phosphite A and B at 5.0 mL L⁻¹), ASM (0.25 g L⁻¹) and a control treatment (non-pulverized). Two pulverizations were performed, in stages V4 and R5, and the inoculation with *C. lindemuthianum* was performed five days after the first pulverization. The phosphite formulations reduced the severity of anthracnose in 68.7% and 55.6%. Another trial was conducted for detecting phosphite in common bean plants, verifying that the concentration of phosphite remained between 1 and 3 mM in foliar tissues, seven days after application. These concentrations *in vitro* test promoted inhibition from 15.0 to 25.7% of *C. lindemuthianum* mycelial growth. The activities of enzymes related to plant defense against pathogens, and the contents of phenolic compounds and lignin were evaluated. The phosphites promoted increase in the activity of enzymes superoxide dismutase, peroxidase, chitinase and β -1,3-glucanase, in addition to an increase in lignification and in the content of phenolic compounds. Phosphite promotes control of anthracnose by direct action against *C. lindemuthianum* and by inducing biochemical defense compounds.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* (L.). *Colletotrichum lindemuthianum*. Resistance induction.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa lugar de destaque na agricultura brasileira, sendo importante fonte de proteínas e minerais na dieta da população, além de possuir notória importância socioeconômica (CARVALHO et al., 2014). As doenças do feijoeiro-comum constituem umas das principais causas da redução da produtividade dessa leguminosa (MORAES et al., 2006). Dentre as doenças, a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, reduz severamente a produção de feijão, podendo causar perdas de até 100% da produção na ausência de medidas de controle (BORGES et al., 2015).

O ataque desse fungo causa desfolha, queda prematura de flores e vagens, deterioração das sementes e, em casos extremos, morte da planta (CAMPA et al., 2014). O manejo da antracnose é dificultado principalmente devido à variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum*. Os principais métodos de controle dessa doença são o genético e o químico (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). O controle químico com o uso de fungicidas pode causar a seleção de patógenos resistentes e efeitos indesejáveis à saúde humana e ao ambiente. Diante disso, métodos alternativos de manejo mais sustentáveis estão sendo estudados para reduzir as perdas causadas por *C. lindemuthianum* no feijoeiro (POLANCO et al., 2012).

A utilização de fosfitos no manejo de doenças em diferentes cultivos tem aumentado nos últimos anos. Os fosfitos são sais inorgânicos do ácido fosforoso (H_3PO_3) e vêm sendo utilizados como produtos alternativos no manejo de fito doenças (GOZZO; FAORO, 2013), pois esses compostos têm sido efetivos no controle de doenças de plantas ocasionadas por diversos patógenos, como pelo oomiceto *Phytophthora cinnamomi* em eucalipto (JACKSON et al., 2000) e por fungos, como *Fusarium solani* em batata (LOBATO et al., 2008), *Alternaria alternata* em macieira (REUVENI; SHEGLOV; COHEN, 2003) e

Phoma costarricensis em cafeeiro (NOJOSA et al., 2009). Ogoshi et al. (2013) verificaram que a aplicação de fosfito de potássio proporcionou redução de 62,5% da severidade da antracnose, causada por *C. gloeosporioides*, na cultura do cafeeiro e a inibição da germinação de conídios, da formação de apressório e o crescimento micelial deste fungo. Silva et al. (2015) verificaram que fosfito de potássio reduziu em 60,4% a severidade da antracnose do feijoeiro em casa-de-vegetação.

Os mecanismos de ação dos fosfitos são complexos e ainda pouco conhecidos. Estudos relatam que os fosfitos apresentam ação direta contra patógenos, provocando a ruptura das hifas e a inibição do crescimento micelial, e também ações indiretas, que incluem estímulos dos mais variados mecanismos de defesa das plantas, tanto na ausência, quanto na presença de patógenos. A aplicação de fosfito em plantas sadias foi relacionada a mecanismos distintos de defesa, como por exemplo, o aumento da transcrição de genes da via do ácido salicílico e do ácido jasmônico/etileno, a ativação de proteínas de defesa, fitoalexinas e inibidores das hidrolases dos patógenos e ainda, a fortificação de barreiras naturais dos tecidos, por meio de aumento na produção de lignina (DALIO et al., 2012; ESHRAGHI et al., 2011).

São poucos os estudos referentes à utilização de fosfitos de potássio no controle de doenças em feijoeiro e principalmente à indução de enzimas relacionadas a mecanismos de defesa. Por isso, objetivou-se neste estudo verificar o efeito de fosfitos de potássio no controle da antracnose e o modo de ação destes produtos em feijoeiro contra *C. lindemuthianum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram conduzidos quatro experimentos em casa de vegetação e laboratório. No primeiro experimento em casa de vegetação, foi avaliado o controle da antracnose. Para isso, foi utilizado o isolado CMLAPS 554 de *C. lindemuthianum*, obtido da Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Para a produção do inóculo, discos de 5 mm de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) com micélio do fungo foram transferidos para vagens de feijoeiro previamente esterilizadas em tubo de vidro com meio BDA. Os tubos foram armazenados em câmara de crescimento a 21 °C e 12 horas de fotoperíodo, por 12 dias. Após o período de incubação, água destilada esterilizada foi adicionada aos tubos para remoção dos conídios utilizados na inoculação.

Sementes de feijoeiro cultivar Pérola, suscetível a *C. lindemuthianum*, foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 6 dm³, contendo solo, areia e substrato comercial para vegetais (Multiplant[®]), na proporção 3:1:1 (v/v/v). Após a emergência, duas plantas foram mantidas em cada vaso, as quais foram irrigadas periodicamente e adubadas de acordo com as recomendações para a cultura. O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados, com quatro repetições e parcela experimental composta por dois vasos.

Foram avaliadas duas formulações de fosfitos comerciais, Fosfito A (P₂O₅ 26% p/p e K₂O 19% p/p) e Fosfito B (fosfito de potássio - P₂O₅ 33,6% p/p e K₂O 29% p/p - produzidos pela Agrichem do Brasil S.A.) na dose de 5,0 mL L⁻¹, o ASM (acibenzolar-S-metílico - 50% p/p – produzido pela Syngenta) na dose de 0,25 g L⁻¹ e uma testemunha sem pulverização. As aplicações foram realizadas até o ponto de escorrimento com auxílio de pulverizador manual, sendo a primeira realizada no estádio V4 (terceira folha trifoliolada) e a segunda

no estágio R5 (botões florais). Cinco dias após a primeira pulverização, três folhas trifolioladas de cada planta foram inoculadas nas faces adaxial e abaxial com suspensão na concentração de 7×10^5 conídios mL⁻¹ e mantidas em câmara úmida por 16 horas.

Foram realizadas cinco avaliações da severidade da antracnose, a cada três dias, a partir do aparecimento dos sintomas. Avaliaram-se três folhas trifolioladas previamente marcadas em cada planta, quantificando-se a severidade da antracnose de acordo com a escala diagramática proposta por Godoy et al. (1997). Índices médios de severidade observados foram transformados em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

O segundo ensaio foi realizado para obter material para o estudo de detecção de fosfito em plantas de feijoeiro em casa de vegetação. Assim, foram utilizadas quatro repetições de um vaso com uma planta de feijoeiro cultivar Pérola, que foram pulverizadas no estágio V4 até o ponto de escorrimento com o auxílio de pulverizador manual com o Fosfito B, nas doses de 5 e 10 mL L⁻¹, o que corresponde a 36,8 e 73,6 mM de fosfito, respectivamente. Como testemunha, foram utilizadas quatro plantas não pulverizadas. Após a pulverização do fosfito, as plantas ficaram sem irrigação por 48 horas. Após esse período, a irrigação foi realizada molhando as folhas e o solo em dias alternados até a coleta dos tecidos para análise. A coleta das folhas ocorreu no sétimo dia após a aplicação, e a detecção semiquantitativa de fosfito nesses tecidos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Stasikowski et al. (2014). As folhas foram lavadas com água deionizada e um grama de tecido foliar fresco de cada repetição foi finamente macerado. Em seguida, 2 mL de água deionizada foram adicionados ao material, misturados e incubados por 1h a 25 °C. Com o

objetivo de remover compostos fenólicos do extrato aquoso, polivinilpirrolidona (PVPP) foi adicionada em uma quantidade equivalente à metade do volume do extrato, misturado e incubado por 30 min a 25 °C. As amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 4 min e 20 µL do extrato vegetal aquoso tratado com PVPP foi adsorvido em discos de papel filtro de fibra de vidro saturados previamente com nitrato de prata (1 M). Os discos foram incubados no escuro, à temperatura ambiente (25 °C), durante 1 hora. A presença de fosfito nas amostras de plantas tratadas foi verificada por comparação visual com padrões preparados pela adição de concentrações conhecidas de fosfito (1 e 3 mM) aos extratos vegetais obtidos nas plantas controle (plantas não pulverizadas).

No terceiro experimento, foi avaliado o efeito direto de diferentes concentrações das formulações de fosfito sobre *C. lindemuthianum*. Fosfitos A e B foram testados nas concentrações 1, 3 e 5 mM de fosfito e, além destas, avaliaram-se também as concentrações de 27,9 mM do Fosfito A e de 36,8 mM do Fosfito B que correspondem à dose utilizada no primeiro experimento, 5 mL L⁻¹ de cada formulação. Foi utilizado, também, o ASM na concentração de 0,25 g L⁻¹ e um tratamento controle sem a adição dos produtos. Para a realização deste experimento, um disco de meio de cultura de 5 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo foi retirado da borda de colônia com 15 dias de idade e transferido para uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com meio de cultura BDA acrescido de cada produto nas concentrações descritas acima. Em seguida, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento a 21 °C e fotoperíodo de 12 horas. No vigésimo dia após a implantação, quando o micélio do tratamento controle ocupou toda a superfície do meio de cultura, foi quantificado o diâmetro final das colônias. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com 10 tratamentos, quatro repetições e parcela constituída por uma placa de Petri contendo colônia pura do fungo em questão. Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott

($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

O quarto experimento foi realizado para verificar as respostas bioquímicas de defesa induzida. Sementes de feijoeiro-comum, cultivar Pérola, foram semeadas em vasos plásticos com capacidade para 6 dm^3 , contendo solo, areia e substrato comercial para vegetais (Multiplant[®]), na proporção 3:1:1 (v/v/v). Os vasos foram mantidos com três plantas após a emergência, que foram irrigadas periodicamente e adubadas de acordo com as recomendações para a cultura.

Plantas de feijoeiro no estádio V4 foram pulverizadas até o ponto de escorrimento com os fosfitos na dose de $5,0 \text{ mL L}^{-1}$ (Fosfito A e B), ASM na dose de $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e um tratamento controle (plantas não pulverizadas). As aplicações foram realizadas por meio de pulverizador manual. Para as análises bioquímicas, foram coletadas amostras foliares nos tempos: um, quatro, oito, doze, dezesseis e trinta dias após a aplicação dos produtos. Foram utilizadas três repetições constituídas de uma planta, em cada tempo de coleta, por tratamento. Em cada coleta, três folhas trifolioladas foram retiradas por planta. O material vegetal foi revestido individualmente com papel alumínio, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. As amostras foram utilizadas na avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidases, quitinases, glucanases e na quantificação de compostos fenólicos solúveis e lignina.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade da peroxidase e superóxido dismutase, os tecidos vegetais foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) a 2% (p/p) até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 1 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual foi adicionado fosfato de potássio 400 mM pH 7,8, acrescido de 10 mM de EDTA e ácido ascórbico 10 mM. O material foi

homogeneizado por 15 segundos em agitação, centrifugado a 12.000 g durante 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

A atividade da peroxidase foi determinada pela oxidação do guaiacol. Adicionou-se 30 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução contendo acetato de sódio 50 mM pH 5,2, guaiacol 20 mM e peróxido de hidrogênio 60 mM. Após incubação a 30 °C por 2 minutos, a absorbância foi medida a 480 nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da peroxidase.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) em meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 1 mM, NBT 750 mM, riboflavina 2 µM e extrato enzimático. Após incubação por 7 minutos em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W, foi realizada a leitura a 560 nm. Uma unidade da superóxido dismutase correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade da quitinase e da β-1,3-glucanase, os tecidos vegetais foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) a 2% (p/p) até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 1 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual foi adicionado 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2. O material foi homogeneizado por 15 segundos em agitação, centrifugado a 12.000 g durante 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

A atividade da quitinase foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático ajustado para 320 µL de uma solução com acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e 70 µL de CM-Chitin-RBV (2 mg mL⁻¹; um substrato específico para quitinase fornecido por LOEWE Biochemica GmbH), em microplacas de

96 cavidades, com volume de 350 μL por cavidade. Após incubação a 35 °C por 80 minutos, as amostras foram acidificadas com 50 μL de HCl 0,5 N, resfriadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 1.450 g por 10 minutos, a 4 °C. Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para nova microplaca, para leitura em 492 nm, em espectrofotômetro de Elisa. A atividade da quitinase foi expressa pela variação de 1 OD₄₉₂ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{492\text{nm}} \text{mgP}^{-1} \text{min}^{-1}$).

A atividade da β -1,3-glucanase foi determinada de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (4 mg mL⁻¹; Loewe Biochemica GmbH). Para promover ação hidrolítica de β -1,3-glucanase, foi adotado tempo de incubação a 35 °C, de 80 minutos. As amostras foram submetidas à leitura de 420 nm. A atividade da β -1,3-glucanase foi expressa pela variação de 1,0 OD₆₂₀ por miligrama de proteína solúvel por minuto ($\Delta_{620\text{nm}} \text{mg P}^{-1} \text{min}^{-1}$).

A proteína total de cada extrato enzimático foi mensurada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina. Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicata.

Para a análise de teores de compostos fenólicos e lignina, os tecidos vegetais foliares coletados foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o precipitado foi utilizado para determinação de lignina.

Para determinação da lignina, foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol a 80%, homogeneizado e centrifugado, a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C por 15 horas. Foi acrescentado 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10). Em seguida, os microtubos foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e colocados em banho-maria a 100 °C por 4 horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água ultrapura e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria a 4 °C por 4 horas para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspense em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 20 µL da suspensão foi transferida para microplacas, onde se completou o volume para 200 µL de NaOH 0,5 M. A absorvância desta solução foi determinada em espectrofotômetro de Elisa, a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca.

O método desenvolvido por Spanos e Wrolstad (1990), com algumas modificações, foi utilizado para a determinação de concentração de compostos fenólicos solúveis totais. Em microplacas, alíquotas de 15 µL do extrato metanólico foram misturadas a 15 µL de metanol 80% e a 30 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,25 N por 5 minutos homogeneizadas com 30 µL de Na₂CO₃ 1 M por 10 minutos e diluídas com 110 µL de água destilada, à temperatura ambiente, por uma hora. Os valores de absorvância desta reação foram

determinados a 725 nm, em espectrofotômetro de Elisa e calculados com base em curva de ácido clorogênico. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente μg de ácido clorogênico por miligrama de massa seca.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As formulações de Fosfito B e A e o ASM promoveram redução da área abaixo da curva de progresso da severidade da antracnose (AACPS) comparado ao controle, pois reduziram em 68,7%, 55,6% e 47,9%, respectivamente, a severidade da doença (Tabela 1).

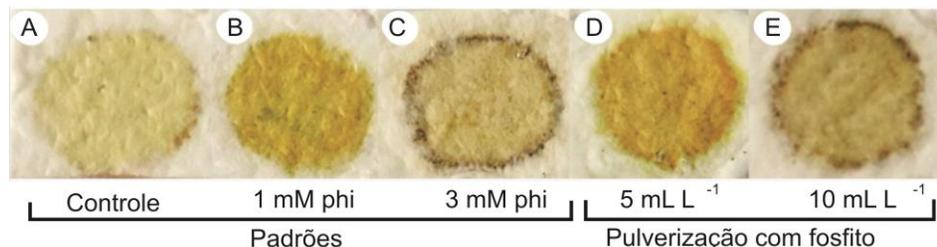
Tabela 1 - Aplicação de fosfitos de potássio e ASM (acibenzolar-S-metílico) e efeitos na área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) e no percentual de redução (%) da antracnose do feijoeiro cultivar Pérola em casa de vegetação.

Tratamentos	AACPS	Redução (%)
Controle	8,9 b	0,0
ASM (0,25 g L ⁻¹)	4,6 a	47,9
Fosfito A (5 mL L ⁻¹)	3,9 a	55,6
Fosfito B (5 mL L ⁻¹)	2,8 a	68,7

Médias com mesma letra na coluna foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

O fosfito foi detectado em amostras de folhas de feijoeiro sete dias após a pulverização com as doses de 5 e 10 mL L⁻¹ (Figura 1). A concentração estimada de fosfito nos tecidos das plantas que receberam apenas uma aplicação dessas doses ficou entre 1 e 3 mM. Com o aumento da dose aplicada, verificou-se uma maior concentração do fosfito nos tecidos.

Figura 1 - Detecção de fosfito de potássio em extratos de tecidos de feijoeiro adsorvidos em disco de papel filtro de fibra de vidro saturados com nitrato de prata a 1M.



Legenda: A: extrato de folhas de plantas não pulverizadas; B: extrato folhas de plantas não pulverizadas com adição de 1 mM de fosfito (phi); C: extrato de folhas de plantas não pulverizadas com adição de 3 mM de fosfito; D: extrato de plantas pulverizadas com 5,0 mL L⁻¹ de fosfito; E: extrato de plantas pulverizadas com 10,0 mL L⁻¹ de fosfito. A pulverização ocorreu sete dias antes da avaliação.

Estudos indicam que nas plantas o fosfito é sistemicamente translocado e segue uma relação fonte-dreno entre os vários pontos de crescimento, tais como raízes, folhas ou frutos (DANOVA-ALT et al., 2008; GUEST; PEGG; WHILEY, 1995). No entanto, não se sabe o tempo que o fosfito permanece nos tecidos de diferentes espécies, ou a taxa em que ele é degradado na planta (STASIKOWSKI et al., 2014). Neste trabalho foi possível comprovar a presença deste composto nas folhas sete dias após a aplicação, o que indica a estabilidade da molécula após a aplicação em plantas de feijão.

Todas as doses testadas dos Fosfitos A e B inibiram o crescimento micelial em relação ao controle (TABELA 2). Com o aumento das doses dos fosfitos, houve redução do crescimento micelial, alcançando inibição total na dose de 5 mL L⁻¹ (equivalente a 36,8 mM de fosfito) para o Fosfito B e inibição de 81,1% para o Fosfito A (equivalente a 27,9 mM de fosfito). O ASM não inibiu o crescimento micelial do fungo, sendo semelhante à testemunha. Nas concentrações mais baixas de fosfito, de 1 a 3 mM, que foram as encontradas nos tecidos foliares aos sete dias após a pulverização, ocorreu inibição de 15,0 a 25,7% do crescimento micelial, o que provavelmente pode contribuir para a

redução da severidade da doença. Outros trabalhos também verificaram ação direta de fosfito sobre fungos do gênero *Colletotrichum* (ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010; OGOSHI et al., 2013). Silva et al. (2015), utilizando microscopia eletrônica, observaram que fosfito de potássio reduziu o crescimento micelial e a emissão do tubo germinativo de *C. lindemuthianum*.

Tabela 2 - Influência de diferentes concentrações de fosfitos de potássio no crescimento e na inibição do crescimento micelial de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Concentração de fosfito (mM)	Diâmetro (cm)	Inibição (%)
ASM (0,25 mL L ⁻¹)	---	7,2 f	1,8
Controle	---	7,3 f	0,0
Fosfito A	1,0	6,2 e	15,0
	3,0	5,5 d	25,7
	5,0	4,6 c	37,5
	27,9*	1,4 b	81,1
Fosfito B	1,0	5,9 d	20,0
	3,0	5,6 d	23,2
	5,0	4,3 c	41,6
	36,8*	0,0 a	100,0

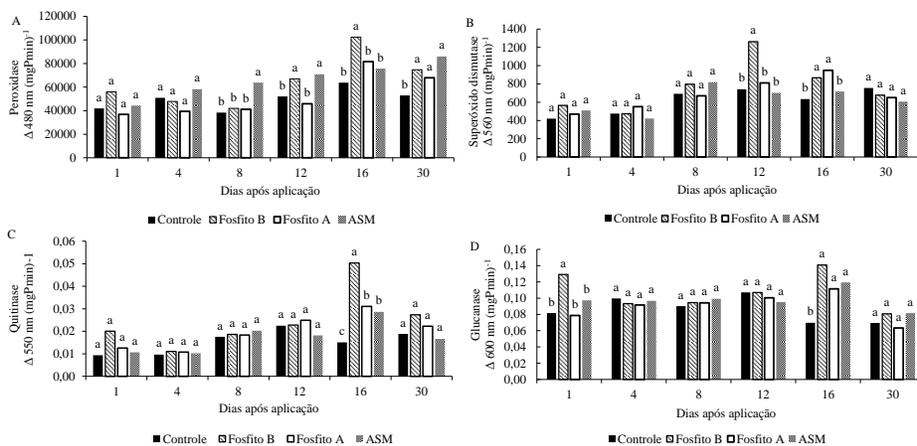
Médias com mesma letra na coluna foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).
*Doses equivalentes a 5 mL L⁻¹ de cada produto.

No experimento de respostas bioquímicas de defesa do feijoeiro, as enzimas superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e β -1,3-glucanase tiveram aumento das atividades após a aplicação dos produtos fosfitos, assim como compostos fenólicos solúveis e lignina.

Foi observado incremento na atividade da peroxidase no oitavo dia após a aplicação do ASM (Figura 2A). No décimo segundo dia, Fosfito B e ASM proporcionaram aumentos na atividade. Já no décimo sexto dia, somente Fosfito B foi superior aos demais tratamentos. Trinta dias após a aplicação, todos os tratamentos proporcionaram incremento na atividade enzimática em relação ao

tratamento controle. A atividade da superóxido dismutase foi maior no tratamento com Fosfito B, doze dias após a aplicação do produto (Figura 2B). No décimo sexto dia, os tratamentos com Fosfito A e Fosfito B proporcionaram maior atividade da enzima. Nos demais tempos avaliados não houve diferença entre os tratamentos.

Figura 2 - Atividade das enzimas peroxidase (A), superóxido dismutase (B), quitinase (C) e β -1,3- glucanase (D) em amostras de feijoeiro cultivar Pérola coletadas aos um, quatro, oito, doze, dezesseis e trinta dias após a aplicação dos tratamentos Fosfito A, Fosfito B, ASM e controle (não pulverizado).



Legenda: Barras com mesma letra em cada dia após a aplicação foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

As enzimas peroxidase e superóxido dismutase são importantes compostos relacionados ao sistema de defesa das plantas, pois estabilizam espécies reativas de oxigênio e protegem as células dos danos oxidativos (HOSSAIN; UDDIN, 2011). Dessa forma, exercem papel importante na proteção da planta contra os danos celulares causados por estresses bióticos ou abióticos. As peroxidases são parte de um seletivo grupo de proteínas relacionadas à indução de mecanismos de defesa das plantas, as chamadas PR-proteínas e

também estão envolvidas no metabolismo de compostos que atuam como barreira contra patógenos, como lignina e suberina, responsáveis por reforçar a parede celular (AVILA et al., 2011).

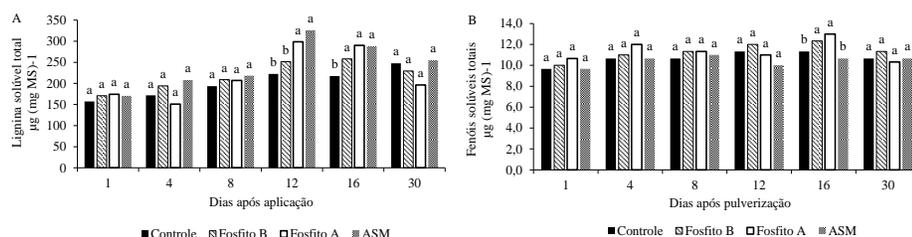
Em estudo com quatro cultivares de feijoeiro, Campos et al. (2004) observaram que a maior atividade da peroxidase ocorreu na cultivar que apresentou maior resistência à antracnose. Leite et al. (2014) também verificaram que a linhagem com resistência ao mofo branco apresentava maior atividade da peroxidase e da superóxido dismutase, o que sugere que essas enzimas atuam na resistência do feijoeiro contra esses patógenos. Silva et al. (2015) estudando o patossistema feijoeiro - *C. lindemuthianum* observam que a aplicação de fosfito de potássio aumentou a atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase em plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno. Na cultura do milho, respostas semelhantes ao presente estudo foram verificadas por Ávila et al. (2011), que observaram aumento da atividade da enzima peroxidase em resposta ao tratamento com fosfito.

Com relação à atividade da quitinase, o tratamento com Fosfito B, no décimo sexto dia após a aplicação dos tratamentos, proporcionou maior atividade da enzima, seguido por Fosfito A e ASM, que também foram superiores ao controle. Nos demais tempos analisados, a atividade da enzima foi similar entre os tratamentos (Figura 2C). No primeiro dia após a aplicação, as plantas tratadas com Fosfito B apresentaram maior atividade da β -1,3-glucanase (Figura 2D). No décimo sexto dia, Fosfito A, Fosfito B e ASM proporcionaram aumento significativo da atividade da enzima em relação ao controle. Quitinases e β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam, respectivamente, quitina e β -1,3-glucana, principais polímeros componentes da parede celular de fungos, exercendo, portanto, ação direta sobre esses patógenos (RESENDE et al., 2007). Os fosfitos utilizados no presente estudo proporcionaram aumento na atividade dessas duas enzimas em feijoeiro. Na cultura da batata, o fosfito de potássio

promoveu controle de *Phytophthora infestans* e aumentou a expressão de β -1,3-glucanases (LOBATO et al., 2008).

Incremento da lignificação foi observado em plantas tratadas com Fosfito A e ASM no décimo segundo dia após a pulverização (Figura 3A). No décimo sexto dia, ASM, Fosfito A e Fosfito B foram superiores ao controle. O reforço da parede celular pela deposição de lignina pode dificultar a colonização pelo patógeno. Ávila et al. (2011), em estudo com a cultura do milho, também verificaram incremento na lignificação após o tratamento com fosfito.

Figura 3 - Lignina solúvel (A) e compostos fenólicos solúveis totais (B) em amostras de feijoeiro cultivar Pérola coletadas um, quatro, oito, doze, dezesseis e trinta dias após a aplicação dos tratamentos Fosfito A, Fosfito B, ASM e controle (não pulverizado).



Legenda: Barras com mesma letra em cada dia após a aplicação foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Na análise de compostos fenólicos solúveis totais observou-se que plantas tratadas com Fosfito A e Fosfito B, no décimo sexto dia após a aplicação dos produtos, apresentaram aumento no teor, diferindo-se do ASM e do controle (Figura 3B). Os compostos fenólicos são produzidos rapidamente e se acumulam após a infecção e são tóxicos a patógenos (CAMPOS et al., 2004). O aumento desses compostos induzidos pelos fosfitos provavelmente pode ter auxiliado na redução dos danos causados pelo *C. lindemuthianum*.

A indução de defesa por fosfito de potássio na ausência do patógeno foi verificada por Eshraghi et al. (2011) que observaram o aumento da expressão de genes de defesa em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Segundo os autores, o tratamento com fosfito poderia permitir o recrutamento de moléculas que participam de diferentes rotas de resposta de defesa contra patógenos biotróficos e necrotróficos. Dalio et al. (2014) relataram que fosfitos se acumulam nas células das plantas na ausência do patógeno, promovendo o efeito de pré-condicionamento (*priming*) para a defesa perante o posterior desafio do patógeno. Lim et al. (2013) estudando fosfito no controle de *Phytophthora infestans* na cultura da batata, verificaram o aumento da regulação de várias proteínas associadas à defesa de plantas após o tratamento com fosfito e sugeriram que a pré-ativação dessas proteínas antes da infecção em plantas tratadas contribui para o aumento dos níveis de resistência da batateira contra patógenos.

Verificou-se no presente trabalho que fosfitos de potássio reduziram a severidade da antracnose e dois modos de ação podem ser evidenciados. O primeiro por meio da toxidez direta, pois a concentração de fosfito encontrada nos tecidos foliares de feijoeiro é suficiente para causar inibição do crescimento micelial de *C. lindemuthianum*, e o segundo, por meio do aumento da atividade e ou teores de compostos relacionados com a defesa do feijoeiro, observando assim o efeito indutor de resistência deste composto.

4 CONCLUSÕES

1. Os fosfitos de potássio reduzem a severidade da antracnose do feijoeiro, causada por *C. lindemuthianum*.

2. Fosfito é detectado nos tecidos foliares aos sete dias após a aplicação em concentração que promove redução do crescimento micelial de *C. lindemuthianum*.

3. Fosfitos de potássio promovem incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, quitinase e glucanase, além de aumento na lignificação e no teor de compostos fenólicos na ausência do patógeno.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 54-59, jan./fev. 2010.
- ÁVILA, F. W. et al. Phosphite supply affects phosphorus nutrition and biochemical responses in maize plants. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 6, p. 646-653, June 2011.
- BORGES, L. L. et al. Two-dimensional electrophoresis-based proteomic analysis of *Phaseolus vulgaris* in response to *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 97, n. 2, p. 249-257, July 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Madison, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 1, n. 4, p. 115, 2014.
- CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 637-643, 2004.
- CARVALHO, J. J. et al. Teor e acúmulo de nutrientes em grãos de feijão comum em semeadura direta, sob déficit hídrico. **Irriga**, Botucatu, n. 1, p. 104-117, 2014. Edição especial.
- DALIO, R. J. D. et al. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **PloS One**, San Francisco, v. 9, p. e87860, Jan. 2014.
- DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.
- DANOVA-ALT, R. et al. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells kinetics and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 31, p. 1510-1521, 2008.

ESHKAGHI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 1086-1095, Dec. 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GODOY, C. V. et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berne, v. 104, p. 336-345, 1997.

GOZZO, F.; FAORO, F. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 51, p. 12473-12491, Dec. 2013.

GUEST, D. I.; PEGG, K. G.; WHILEY, A. W. Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk injected phosphonates. **Horticultural Reviews**, New York, v. 17, p. 299-330, 1995.

HOSSAIN, M. A.; UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1094-1101, Oct. 2011.

JACKSON, T. J. et al. Action of the fungicide phosphate on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 49, p. 147-154, 2000.

LEITE, M. E. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 138, n. 2, p. 391-404, Feb. 2014.

LIM, S. et al. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. **Journal of Proteomics**, New York, v. 93, p. 207-223, Nov. 2013.

LOBATO, M. C. et al. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, p. 349-358, 2008.

MORAES, S. R. G. et al. Efeito de fontes de silício na incidência e na severidade da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 69-75, 2006.

NOJOSA, G. B. A. et al. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha-de-Phoma. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, p. 60-62, 2009.

OGOSHI, C. et al. Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1558-1565, Nov. 2013.

POLANCO, L. R. et al. Biochemical aspects of bean resistance to anthracnose mediated by silicon. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 161, p. 140-150, July 2012.

RESENDE, M. L. V. et al. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. 213-221, 2007.

REUVENI, M.; SHEGLOV, D.; COHEN, Y. Control of moldy-core decay in apple fruits by aminobutyric acids and potassium phosphates. **Plant Disease**, Quebec, v. 87, p. 933-936, 2003.

SILVA, J. L. et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, n. 8, p. 243-253, Feb. 2015.

SILVA, K. J. D. e; SOUZA, E. A. de; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 155, p. 241-247, 2007.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Easton, v. 38, p. 1565-1571, 1990.

STASIKOWSKI, P. et al. A direct chemical method for the rapid, sensitive and cost effective detection of phosphite in plant material. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 43, n. 2, p. 115-121, Mar. 2014.

**ARTIGO 2 - FOSFITO NO TRATAMENTO DE SEMENTES DO
FEIJOEIRO: CONTROLE DE *Rhizoctonia solani* E *Colletotrichum
lindemuthianum*, INDUÇÃO DE RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE DEFESA E
COMPATIBILIDADE COM BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO**

Bruno Henrique Garcia Costa⁽¹⁾, Mário Lúcio Vilela de Resende⁽¹⁾, Ana Cristina
Andrade Monteiro⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Campus UFLA,
Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. brunohenriquegc@yahoo.com.br,
mlucio@dfp.ufla.br, monteiroaca@yahoo.com.br.

ARTIGO REDIGIDO CONFORME A NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

Avaliou-se o fosfito de potássio (FP) aplicado em sementes de feijoeiro no controle de *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*, na indução de respostas bioquímicas de defesa da planta e na compatibilidade com *Rhizobium tropici*, bactéria fixadora de nitrogênio. No primeiro ensaio, as sementes foram inoculadas com *R. solani* e posteriormente tratadas com FP (5,0 mL kg⁻¹ sementes). Foram realizadas avaliações do índice de velocidade de emergência (IVE) e a porcentagem de emergência total. No segundo ensaio, sementes foram tratadas com FP (5,0 mL kg⁻¹ sementes), semeadas em vasos e inoculadas com o fungo *C. lindemuthianum* (1 x 10⁶ conídios mL⁻¹) na parte aérea do feijoeiro (estádio V2 de desenvolvimento). Foi avaliada a severidade da antracnose e, em seguida, foi realizada a coleta de tecidos foliares para a quantificação das atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase, fenilalanina amônia-liase e o teor de lignina. No terceiro ensaio, sementes de feijoeiro após a aplicação de FP foram inoculadas com a bactéria *R. tropici* e semeadas em vasos em casa de vegetação. Foi avaliado o número de nódulos por sistema radicular, a massa de nódulos secos, a massa seca, o teor e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea. FP promoveu maior IVE e aumento de 40,1% do estande de plantas em relação à testemunha inoculada com *R. solani*. FP proporcionou redução de 56,9% da área abaixo da curva de progresso da antracnose, sendo significativamente semelhante ao tratamento com fungicida. Foi observado aumento das atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase, fenilalanina amônia-liase e da lignificação das plantas. A aplicação de FP nas sementes resultou em maior massa de nódulos. O número de nódulos formados, o teor e o acúmulo de nitrogênio foram semelhantes à testemunha inoculada com *R. tropici*. Assim, o tratamento de sementes com FP promove o controle de *R. solani* e de *C. lindemuthianum* e proporciona o incremento de compostos de defesa nos estádios iniciais de desenvolvimento do feijoeiro. FP é compatível com a inoculação de *R. tropici*.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L. Antracnose. Indução de resistência. *Rhizobium tropici*.

Phosphite in the treatment of bean common seeds: control of *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum lindemuthianum*, induction of biochemical defense responses and compatibility with nitrogen fixing bacteria

ABSTRACT

In this work, we evaluated potassium phosphite (PP) applied to bean seeds for controlling *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum lindemuthianum*, in the induction of biochemical defense responses and the compatibility with *Rhizobium tropici*, nitrogen fixing bacterium. In the first trial, the seeds were inoculated with *R. solani* and, subsequently, treated with PP (5.0 mL kg⁻¹ seeds). Evaluations of the emergence speed index (ESI) and percentage of total emergence were conducted. In the second trial, seeds were treated with PP (5.0 mL kg⁻¹ seeds), sown in pots and inoculated with the *C. lindemuthianum* (1 x 10⁶ conidia mL⁻¹) in the aerial part of the common bean plant (development stage V2). The severity of the anthracnose was evaluated and, subsequently, foliar tissue was collected to quantify the activities of enzymes catalase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and content of lignin. In the third trial, after application of PP, bean seeds were inoculated with *R. tropici* and sown in pots maintained in greenhouse. The number of nodules per root system, mass of dry nodules, dry mass and content and accumulation of nitrogen in the aerial part were evaluated. PP promoted higher ESI and an increase of 40.1% in plant stand in relation to the control inoculated with *R. solani*. PP reduced in 56.9% the area under the anthracnose progress curve, being significantly similar to the treatment with fungicide. We verified an increase in the activity of enzymes catalase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and lignification of the plants. The application of PP to the seeds resulted in greater nodule mass. The number of nodules formed and content and accumulation of nitrogen was similar to the control inoculated with *R. tropici*. Thus, seed treatment with PP controls *R. solani* and *C. lindemuthianum*, and increases defense compounds in the initial development stages of the common bean plant. PP is compatible to the inoculation with *R. tropici*.

Keywords: *Phaseolus vulgaris* L. Anthracnose. Resistance induction. *Rhizobium tropici*.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) está sujeita ao ataque de diversos patógenos que podem ser transmitidos pelas sementes (REY et al., 2009). A podridão radicular e o tombamento de plantas são doenças causadas pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn e que resultam em danos consideráveis ao feijoeiro. O fungo provoca lesões na parte basal do hipocótilo e na raiz principal das plântulas, acarretando redução do estande. A antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, é uma das mais importantes doenças da cultura. Seus sintomas podem ser observados em toda parte aérea da planta, provocando danos já no estágio de plântulas, onde podem ser observadas lesões nos cotilédones (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Em muitas áreas onde o cultivo do feijoeiro é realizado todos os anos, torna-se necessário o tratamento de sementes com fungicidas para evitar a incidência de doenças que afetam a cultura, apesar do potencial negativo de impacto ambiental desses produtos (SARTORATO; RAVA, 1994), além do risco da incompatibilidade entre fungicidas e bactérias fixadoras de nitrogênio quando em contato nas sementes (ARAÚJO; ARAÚJO, 2006).

Segundo Lobato et al. (2008), a utilização de fosfito pode ser considerada uma estratégia adicional a ser incluída em programas de manejo de doenças para reduzir o intensivo uso de fungicida. No Brasil, os fosfitos são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como fertilizantes para aplicação foliar ou via solo, porém a utilização dos fosfitos tem sido investigada principalmente no controle de doenças de plantas (ARAÚJO et al., 2014; DALIO et al., 2012; DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010). Estudos relatam que os fosfitos exercem um complexo modo de ação contra fungos e oomicetos, que envolvem ação direta, por meio da inibição da esporulação ou redução da taxa de crescimento, e efeitos indiretos, como uma

rápida e forte estimulação de mecanismos de defesa da planta tanto na presença quanto na ausência do patógeno (DALIO et al., 2012; DELIOPOULOS; KETTLEWELL; HARE, 2010; ESHRAGHI et al., 2011; LIM et al., 2013).

A aplicação de fosfito de forma preventiva em batata semente proporcionou redução significativa de doenças causadas por *Phytophthora infestans*, *Fusarium solani* e *R. solani* (LOBATO et al., 2008). Na literatura, são poucos os relatos sobre a aplicação de fosfito em sementes e na cultura do feijoeiro ainda não foram desenvolvidos estudos sobre seu uso no tratamento de sementes. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito proporcionado por fosfito aplicado nas sementes de feijoeiro visando ao controle de *R. solani* e de *C. lindemuthianum*, a indução de respostas bioquímicas de defesa da planta e a compatibilidade com *Rhizobium tropici*, bactéria fixadora de nitrogênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio para avaliar o potencial de fosfito de potássio no controle de *R. solani* foi conduzido em casa de vegetação. Sementes de feijoeiro cultivar Pérola foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos, lavadas seis vezes com água destilada esterilizada e, em seguida, secas em capela de fluxo laminar. Posteriormente, as sementes foram inoculadas com *R. solani* pelo método da restrição hídrica, descrito por Machado et al. (2012). O fungo foi obtido a partir de sementes infectadas e isolado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Após três dias de crescimento, foram retirados discos de micélio de aproximadamente 1 cm de diâmetro e transferidos para placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA com adição de manitol (71,3 g L⁻¹ BDA), com potencial hídrico ajustado para -1,0 MPa, segundo cálculo do *software* SPPM (MICHEL; RADCLIFFE, 1995). As colônias foram mantidas em incubação à temperatura de 21 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h, por três dias. As sementes foram depositadas formando uma camada única sobre as colônias e permaneceram em contato com o fungo por 48 horas, nas mesmas condições de incubação já descritas.

Posteriormente, as sementes foram submetidas aos seguintes tratamentos: fosfito de potássio (FP - P₂O₅ 33,6 % p/p e K₂O 29% p/p) na dose de 5,0 mL kg⁻¹ sementes; fungicida (feniluréia - 25% m/v) na dose de 3,0 mL kg⁻¹ sementes; sementes não tratadas e inoculadas (testemunha inoculada), sementes não tratadas e não inoculadas (testemunha não inoculada). Após receberem os tratamentos, as sementes foram secas em capela de fluxo laminar durante duas horas e então semeadas em caixas de polietileno com dimensões de 48 x 29 x 10 cm, contendo areia esterilizada. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições e parcela constituída por uma caixa com 50 sementes. Foi realizada a contagem diária do número de plântulas emergidas, para o cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE),

proposto por Maguire (1962). Foi avaliada, também, a porcentagem de emergência total em cada caixa, que foi calculada no décimo quarto dia após a semeadura. Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

Para avaliação do controle da antracnose e das respostas bioquímicas de defesa induzida em feijoeiro por fosfito, foi conduzido um experimento em casa de vegetação. Sementes de feijoeiro cultivar Pérola foram tratadas com: fosfito de potássio (FP - P_2O_5 33,6% p/p e K_2O 29% p/p) na dose de $5,0 \text{ mL kg}^{-1}$ sementes; fungicida (carboxanilida - 20% m/v + dimetilditiocarbamato - 20% m/v) na dose de $2,5 \text{ mL kg}^{-1}$ sementes e uma testemunha sem tratamento. Após a aplicação dos produtos, as sementes secaram por duas horas. Posteriormente foram semeadas em vasos com capacidade para $2,5 \text{ dm}^3$, contendo substrato comercial (Multiplant[®]). Foram mantidas cinco plantas por vaso, as quais foram irrigadas periodicamente e adubadas com solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnon (1950).

Para a inoculação das plantas, foi utilizado o isolado CMLAPS 554 de *C. lindemuthianum*, obtido da coleção micológica do Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. No preparo do inóculo, discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) contendo micélio do fungo foram transferidos para vagens de feijoeiro previamente esterilizadas em tubo de vidro com meio BDA. Os tubos foram armazenados em câmara de crescimento a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, por 12 dias. Após o período de incubação, água destilada esterilizada foi adicionada aos tubos para remoção dos conídios, que foram utilizados para a inoculação. Doze dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam as folhas primárias completamente abertas (V2), foram inoculadas nas faces adaxial e abaxial com suspensão na concentração de 1×10^6 conídios

mL⁻¹, utilizando pulverizador manual. As plantas foram mantidas em câmara úmida por 16 horas.

A avaliação da antracnose foi realizada quantificando-se a severidade em todas as folhas primárias das cinco plantas de cada vaso, em três repetições, de acordo com a escala diagramática proposta por Godoy et al. (1997). Foram realizadas quatro avaliações, a cada dois dias, a partir do aparecimento dos sintomas. Índices médios de severidade observados foram transformados em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

Para análise enzimática, não foi utilizado o tratamento fungicida, o qual foi empregado somente como padrão de controle nas avaliações da severidade da antracnose. Amostras foliares de plantas inoculadas e não inoculadas de cada tratamento foram coletadas nos seguintes tempos: 0 (antes da inoculação), 24, 48 e 96 horas após a inoculação e 168 horas após a inoculação (aparecimento dos sintomas). A avaliação de lignina solúvel total foi realizada somente no tempo de 168h após a inoculação, nos tratamentos FP e testemunha (não inoculados). Foram coletadas cinco plantas em cada uma das três repetições, em cada tempo. O material vegetal foi revestido individualmente com papel alumínio, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80 °C. As amostras foram utilizadas na avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, fenilalanina amônia-liase e na quantificação de lignina.

A proteína total do cada extrato enzimático foi mensurada, de acordo com o método de Bradford (1976), usando-se uma curva padrão de albumina sérica bovina. Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicata.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade da superóxido dismutase e da catalase, os tecidos vegetais foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) a 2% (p/p) até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 1 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionou fosfato de potássio 400 mM pH 7,8, acrescido de 10 mM de EDTA e ácido ascórbico 10 mM. O material foi homogeneizado por 15 segundos em agitação, centrifugado a 12.000 g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), em meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 1 mM, NBT 750 mM, riboflavina 2 μ M e extrato enzimático. Após incubação por 7 minutos em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W foi realizada a leitura a 560 nm. Uma unidade da superóxido dismutase correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Para a atividade da catalase foram adicionados 10 μ L do extrato enzimático em um tampão de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM pH 7,0, peróxido de hidrogênio 12,5 mM e água, ajustado para 200 μ L de solução final. A atividade da catalase foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 3 minutos a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 18 $M^{-1} cm^{-1}$ foi usado para calcular a atividade da catalase (HAVIR; MCHALE, 1987).

Para medir a atividade da fenilalanina amônia-liase, os tecidos foliares foram macerados conforme para superóxido dismutase. Para cada grama de pó macerado, foi adicionado 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, acrescido de 1 mM de PMSF. A solução foi centrifugada a 13.000 g por 20 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi usado como fonte enzimática. A atividade

da fenilalanina amônia-liase foi determinada conforme metodologia descrita por Zucker (1965). Foram adicionados 10 μL do extrato enzimático, ajustado para 200 μL de solução contendo Tris-HCl 100 mM pH 8,8 e fenilalanina 50 mM. Após incubação a 37 °C por 20 minutos, a absorbância foi medida a 280 nm. O coeficiente de extinção molar de 5.000 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ foi usado para se calcular a atividade da fenilalanina amônia-liase.

Para a análise de lignina, os tecidos vegetais foliares coletados foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 24 horas. Uma alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos. Para determinação da lignina, foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol a 80%, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a 65 °C por 15 horas. Posteriormente, foi acrescentado 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10). Em seguida, os microtubos foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e colocados em banho-maria a 100 °C por 4 horas. Posteriormente os microtubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL de água ultrapura e novamente centrifugado, a 12.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido em agitador rotativo, por 15 horas, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 μL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria a 4 °C por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. Em seguida, a mistura foi

centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 2,0 mL de NaOH 0,5 M. Uma alíquota de 200 µL da suspensão foi transferida para microplacas e a absorbância desta solução determinada em espectrofotômetro de Elisa a 280 nm. Os valores foram calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca. Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

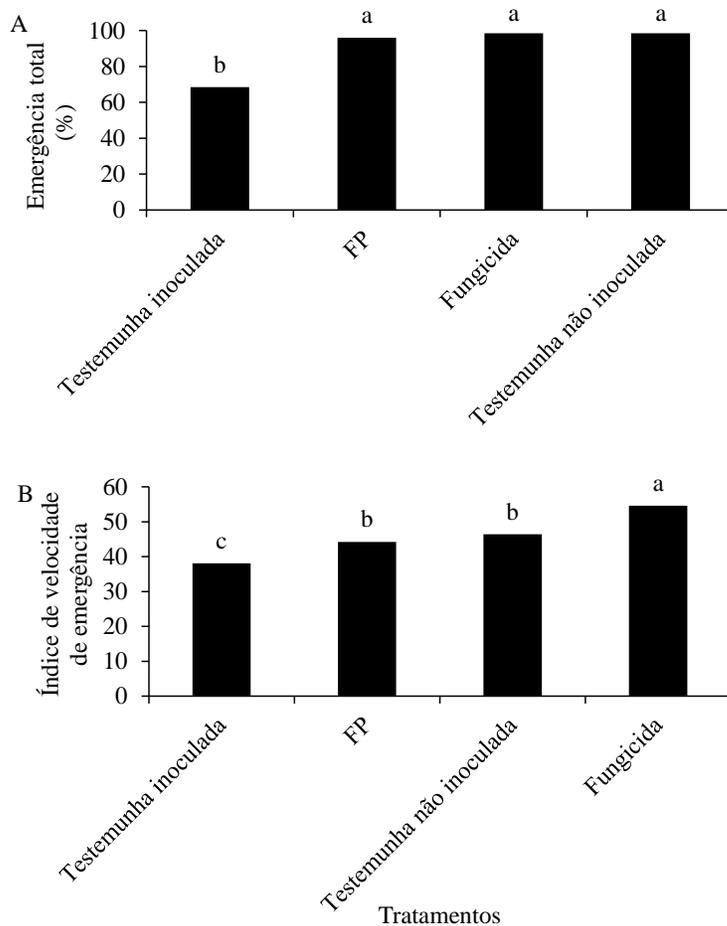
Para verificar a compatibilidade da aplicação de fosfito com a bactéria fixadora de nitrogênio *R. tropici* foi realizado um experimento em casa de vegetação. Sementes de feijoeiro cultivar Pérola foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos. Em seguida, foram realizadas seis lavagens sucessivas em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram tratadas com: Inoculante (inoculante turfoso à base de *R. tropici* contendo as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4088, com garantia de $3,0 \times 10^9$ UFC g⁻¹) na dose de 2 g kg⁻¹ sementes; fosfito de potássio (FP - P₂O₅ 33,6% p/p e K₂O 29% p/p) na dose de 5,0 mL kg⁻¹ sementes + Inoculante (2 g kg⁻¹); fungicida (carboxanilida - 20% m/v e dimetilditiocarbamato - 20% m/v) na dose de 2,5 mL kg⁻¹ sementes + Inoculante (2 g kg⁻¹); dois tratamentos testemunhas (não inoculadas com *R. tropici*) com adubação ou sem adubação mineral nitrogenada (350 mg planta⁻¹, na fonte nitrato de amônio). As sementes foram tratadas com os produtos e posteriormente com o inoculante. Duas horas após o tratamento, as sementes foram semeadas em vasos em casa de vegetação. O experimento foi conduzido em blocos casualizados, com quatro repetições e parcela experimental composta por um vaso (2,5 dm³) contendo substrato comercial para vegetais Multiplant[®]. Foram semeadas quatro sementes por vaso e, após a emergência, foi realizado o desbaste, permanecendo duas plantas. Os vasos foram irrigados, periodicamente, com solução nutritiva de cultivo proposta

por Hoagland e Arnon (1950) com restrição do elemento nitrogênio. Aproximadamente 50 dias após a semeadura, no início do florescimento (R5), foi realizada a contagem do número de nódulos por sistema radicular, a avaliação da massa de nódulos secos, da massa da parte aérea seca, além do teor e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Quando significativos pelo teste F, os valores foram agrupados pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento com controle de *R. solani*, foi observado para os tratamentos Fungicida e FP, 98,5 e 96,0% de plantas emergidas, respectivamente (Figura 1A). Esses tratamentos não diferiram entre si, porém foram superiores à Testemunha inoculada, que teve 68,5% das plantas emergidas. Em relação à Testemunha inoculada, o aumento do estande de plantas proporcionado pelo tratamento das sementes com Fungicida e com FP foi de 43,8% e de 40,1% respectivamente. Para o índice de velocidade de emergência (IVE), o tratamento Fungicida apresentou valor superior em relação aos demais tratamentos (Figura 1B). O tratamento com FP foi semelhante à Testemunha não inoculada e proporcionou maior IVE em relação à Testemunha inoculada.

Figura 4 - Aplicação de fosfito de potássio (FP) e de Fungicida (feniluréia) na semente e efeitos na emergência total (%) e no índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de feijoeiro cultivar Pérola, em casa de vegetação.



Legenda: Inoculação das sementes com *R. solani*. Colunas com mesma letra foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

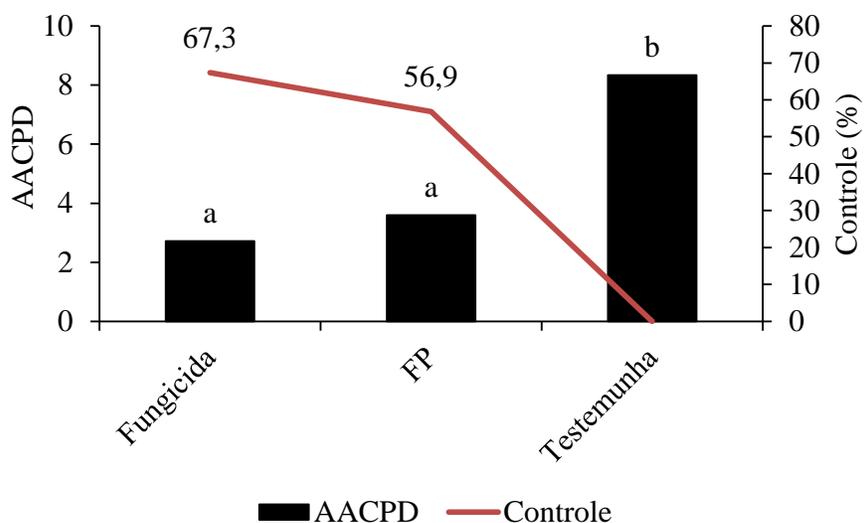
A manutenção do estande é condição fundamental para se alcançar a produtividade desejada na cultura do feijoeiro. Os principais danos causados por *R. solani*, incluem a redução do estande e do vigor das plântulas, com consequente perda de produtividade (TOLEDO-SOUSA et al., 2009). O

tratamento FP proporcionou controle de *R. solani* em sementes de feijoeiro inoculadas, assegurando a emergência, bem como protegeu as plântulas do tombamento de pós-emergência causado pelo patógeno. Além disso, FP aumentou o IVE em relação à Testemunha inoculada e não diferiu significativamente da Testemunha não inoculada, o que demonstra que FP não promoveu ação fitotóxica sobre as sementes. O maior IVE é importante para reduzir o tempo de exposição de tecidos suscetíveis a patógenos presentes na própria semente ou no solo.

Na cultura da batata, o tratamento de tubérculos com fosfito de potássio reduziu a queimeira em tubérculos inoculados com *Phytophthora infestans*, resultando em 90% de emergência de plântulas, enquanto em tubérculos inoculados e sem tratamento, as plantas não emergiram. Fosfito de potássio também reduziu em 75% a podridão causada por *F. solani* e em 25% a severidade de *R. solani* (LOBATO et al., 2008). O tratamento de sementes de soja com fosfito de manganês reduziu a incidência de *Colletotrichum truncatum* e de *Sclerotinia sclerotiorum* em plântulas de soja e promoveu redução do crescimento micelial *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum truncatum* e de *Macrophomina phaseolina* (ESPINDOLA, 2015).

No ensaio com controle da antracnose em feijoeiro, os tratamentos Fungicida e FP promoveram redução significativa da severidade da doença, com controle de 67,3 e 56,9%, respectivamente, em relação à Testemunha (Figura 2). Os produtos exerceram o controle preventivo da doença, já que foram aplicados apenas nas sementes e a inoculação realizada na parte aérea nos estádios iniciais de desenvolvimento, doze dias após a semeadura. A pré-ativação de proteínas associadas à defesa de plantas, por fosfito, antes da infecção, contribui para o aumento dos níveis de resistência da hospedeira contra patógenos (LIM et al., 2013).

Figura 5 - Aplicação de fosfito de potássio (FP) e de Fungicida (carboxanilida + dimetilditiocarbamato) na semente e efeito na área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) e no percentual de controle (%) da antracnose do feijoeiro cultivar Pérola em casa de vegetação.



Legenda: Colunas com mesma letra foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

No estudo das respostas de defesa induzidas por FP, houve aumento da atividade da enzima superóxido dismutase 24 horas após a inoculação de *C. lindemuthianum* (Cl), nos tratamentos FP e FP+Cl (Figura 3A). Nos demais tempos avaliados, não houve diferença entre os tratamentos. Para a atividade da catalase, ocorreu aumento da enzima 96 horas após a inoculação, nos tratamentos FP, FP+Cl e Testemunha+Cl (Figura 3B).

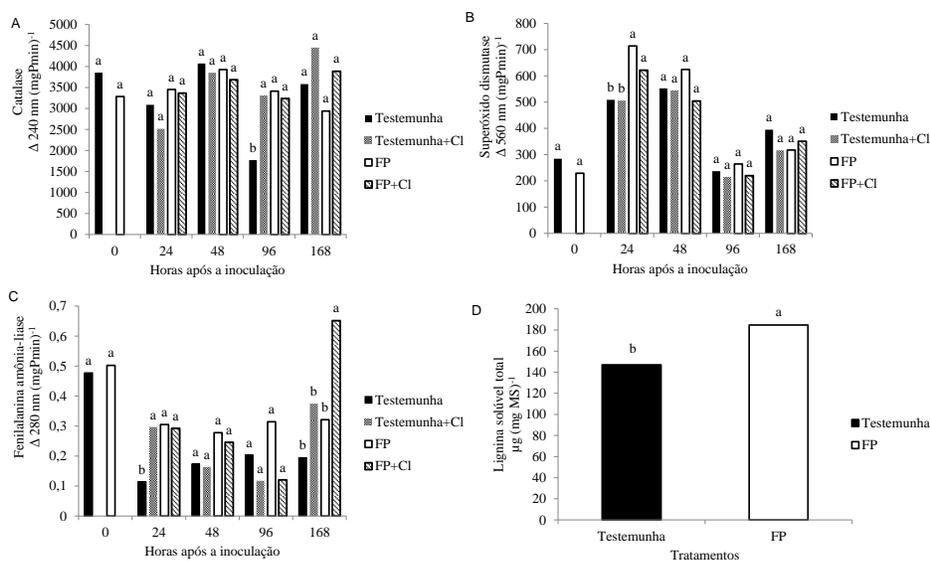
Plantas sob condições de estresse, geralmente usam um complexo sistema de defesa antioxidante constituído de um diversificado leque de enzimas, dentre as quais estão a superóxido dismutase e a catalase (HOSSAIN; UDDIN, 2011). No presente trabalho, observou-se que o tratamento com FP induziu plantas de feijoeiro, inoculadas ou não, aumentando a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. Em feijoeiro cultivado com fosfito

fornecido via solução nutritiva, Avila et al. (2013) também observaram aumento da atividade da catalase.

Houve incremento da atividade da fenilalanina amônia-liase 24 horas após a inoculação, nos tratamentos FP, FP+Cl e Testemunha+Cl em relação ao tratamento Testemunha (Figura 3C). No tempo de 168 horas após a inoculação, novamente o FP+Cl teve incremento na atividade. A fenilalanina amônia-liase é uma importante enzima da rota dos fenilpropanoides, que leva à formação de lignina e compostos fenólicos (RAES et al., 2003). A sua atividade pode mudar rapidamente sobre a influência de vários fatores, como o ataque de patógenos e o tratamento com indutores de resistência. Por isso, muitos autores relatam que a enzima pode servir como um marcador para indução de resistência em plantas a doenças (MANDAL; MALLICK; MITRA, 2009).

O teor de lignina solúvel total foi significativamente maior em plantas tratadas com FP em relação à Testemunha (Figura 3D). A lignina é um importante componente da resistência de plantas. Plantas jovens, devido à baixa lignificação nos tecidos, são mais suscetíveis à infecção por *C. lindemuthianum* que plantas adultas (HALL, 1991). Dessa forma, no presente estudo, plantas tratadas com FP estavam mais lignificadas, o que resultou em redução da severidade da antracnose. A biossíntese da lignina envolve uma série de enzimas, dentre elas a fenilalanina amônia-liase, que catalisa a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, resultando em compostos fenólicos e lignina, que conferem maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA; NOZUE; YASUDA, 2001).

Figura 6 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), fenilalanina amônia-liase (C) em amostras de feijoeiro cultivar Pérola coletadas 0, 24, 48, 96 e 168 horas após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum* (CI).



Legenda: Lignina solúvel (D) foi avaliada apenas 168 horas após a inoculação. Colunas com mesma letra em cada tempo após a inoculação foram agrupadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). FP - fosfito de potássio.

Após o tratamento das sementes com FP foi verificado que houve incremento da atividade de compostos relacionados à defesa do feijoeiro na presença e na ausência do fungo *C. lindemuthianum*. Em trabalhos com aplicação de fosfito na parte aérea foi, também, verificado que fosfito é capaz de induzir resistência em plantas saudias e doentes (DALIO et al., 2012; ESHRAGHI et al., 2011; SILVA et al., 2015). Silva et al. (2015) verificaram que fosfito de potássio, em aplicação foliar, reduziu em 60,4% a severidade da antracnose do feijoeiro em casa de vegetação e promoveu aumento da atividade de compostos relacionados à defesa em feijoeiro, como as enzimas fenilalanina amônia-liase e peroxidase. O incremento na atividade ocorreu em plantas inoculadas e não inoculadas com *C. lindemuthianum*.

No ensaio para verificar a ação de fosfito na nodulação, na massa de nódulos secos, na massa da parte aérea seca e no teor e acúmulo de N, não houve diferença entre os tratamentos Inoculante, FP+Inoculante e Fungicida+Inoculante para o número de nódulos (Tabela 1). Os tratamentos sem aplicação de inoculante apresentaram baixa nodulação. Para massa de nódulos secos, os tratamentos com FP+Inoculante e Fungicida+Inoculante foram superiores ao Inoculante, apresentando maior massa. Segundo Alcântara Neto et al. (2014), normalmente a aplicação de fungicidas tem sido realizada antes da inoculação para reduzir os efeitos tóxicos sobre as bactérias fixadoras de nitrogênio. Entretanto, ainda ocorrem incompatibilidades dos microrganismos simbiotes com alguns fungicidas (ARAÚJO; ARAÚJO, 2006). Segundo Barbosa e Gonzaga (2012), a maioria das combinações de fungicidas indicados para o tratamento de sementes reduz a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio. No presente trabalho, o tratamento das sementes de feijão com o Fungicida não prejudicou a formação dos nódulos. FP, também, se mostrou compatível com *R. tropici*, não interferindo na nodulação e ainda, proporcionando aumento da massa de nódulos secos.

O processo de nodulação é controlado, em grande parte, pela troca de sinais entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira. Nos estádios iniciais de formação dos nódulos radiculares, a espécie hospedeira libera sinais na sua rizosfera, identificados principalmente como compostos fenólicos (flavonoides) e betaínas, que são percebidos pela bactéria, desencadeando a expressão coordenada de uma série de genes da nodulação (KRISHNAN; KUO; PUEPPKE, 1995; MERCANTE; GOI; FRANCO, 2002). O tratamento das sementes com FP induziu, nos estádios iniciais do feijoeiro, maior atividade da fenilalanina amônia-liase, enzima da rota dos fenilpropanoides e que leva a formação de compostos fenólicos. Estudos futuros mais detalhados poderão

esclarecer a possível influência dessa rota induzida por FP no número e na massa de nódulos.

A massa da parte aérea seca e o acúmulo de nitrogênio na parte aérea não diferiram entre os tratamentos Inoculante, Testemunha com N, FP+Inoculante e Fungicida+Inoculante (Tabela 1), indicando que o tratamento de sementes com FP não foi prejudicial ao desenvolvimento da parte aérea e à fixação de nitrogênio em plantas de feijão. Todos os tratamentos apresentaram eficiência no acúmulo de N e no crescimento da parte aérea em relação à Testemunha sem N.

Tabela 3 - Número de nódulos (NN), massa de nódulos secos (MNS) e da parte aérea seca (MPAS), teor de nitrogênio na parte aérea (TNPA) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) de plantas de feijão após o tratamento de sementes com fosfito de potássio (FP) e Fungicida (carboxanilida + dimetilditiocarbamato), em casa de vegetação.

Tratamento	NN	MNS	MPAS	TNPA	ANPA
Inoculante	86,0a	195,3b	3,0a	3,0a	89,6a
Testemunha sem N	5,9b	21,6d	0,9b	3,2a	28,8b
Testemunha com N	23,0b	89,0c	3,3a	2,9a	97,7a
FP+Inoculante	94,8a	253,7a	3,2a	3,1a	99,7a
Fungicida+Inoculante	79,1a	228,0a	2,8a	3,3a	92,8a

Valores com mesma letra na coluna foram agrupados pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). NN - número de nódulos planta⁻¹; MNS - mg planta⁻¹; MPAS - g planta⁻¹; TNPA - (%); ANPA - mg planta⁻¹.

Espindola (2015) verificou que uma formulação de fosfito de manganês também não apresentou toxicidade à simbiose entre a planta e bactérias formadoras dos nódulos na cultura da soja. Segundo o autor, o desenvolvimento

de novos produtos para serem empregados no tratamento de sementes deve objetivar além de seu efeito principal, obter características secundárias que no mínimo não prejudiquem a viabilidade de outras modalidades de tratamento de sementes. Araújo e Araújo (2006) sugerem a necessidade de encontrar técnicas de utilização de produtos no tratamento de sementes sem comprometer a sobrevivência da bactéria e, conseqüentemente, a nodulação.

Estudos relacionados à indução de resistência em plantas por fosfito têm aumentado nos últimos anos. Esses estudos correlacionam o estímulo de respostas de defesa após o tratamento com fosfito na parte aérea de plantas, aumentando a expressão de genes, formação de estruturas, ativação de proteínas relacionadas à patogênese e compostos relacionados à defesa (fitoalexinas) (CASTANHO et al., 2014; DALIO et al., 2012; DANIEL; GUEST, 2006). O presente estudo é o primeiro relato de indução de resistência em feijoeiro por fosfito após o tratamento de sementes. Além disso, fosfito de potássio proporcionou o controle de *R. solani* e de *C. lindemuthianum* e foi compatível com as bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium*. Dessa forma, a aplicação de fosfito de potássio na semente constitui-se em uma técnica promissora para integrar os métodos de manejo de doenças na cultura do feijoeiro.

4 CONCLUSÕES

1. O tratamento de sementes com fosfito de potássio promove o controle do fungo *Rhizoctonia solani* inoculado em sementes de feijoeiro.

2. Fosfito de potássio aplicado na semente promove o incremento de compostos de defesa em feijoeiro nos estádios iniciais de desenvolvimento, com consequente redução da severidade da antracnose.

3. Fosfito de potássio aplicado na semente é compatível com a bactéria fixadora de nitrogênio, *Rhizobium tropici*.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA NETO, F. et al. Tempo de contato e de combinações de fungicidas, aditivo e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. **Revista Agro@ambiente On-line**, Boa Vista, v. 8, n. 1, p. 149-154, 2014.

ARAÚJO, A. S. F.; ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 973-976, 2006.

ARAÚJO, J. L. et al. Crescimento e acúmulo de fósforo pelo feijoeiro tratado com fosfato e fosfito via foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Passo Fundo, v. 35, n. 4, p. 2381-2394, 2014.

ÁVILA, F. W. et al. Effect of phosphite supply in nutrient solution on yield, phosphorus nutrition and enzymatic behavior in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 7, n. 5, p. 713-722, Jan. 2013.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2012. 247 p. (Documentos, 272).

BIANCHINI, A. A. C.; MARINGONI, E.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H. L. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.

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

CASTANHO, G. et al. Fosfito de potássio como indutor de gliceolina em soja. **Iniciação Científica CESUMAR**, Maringá, v. 16, n. 2, p. 131-137, 2014.

DALIO, R. J. D. et al. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, n. 3/5, p. 194-201, 2006.

DELIOPOULOS, T.; KETTLEWELL, P. S.; HARE, M. C. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 10, p. 1059-1075, 2010.

ESHRAGHI, L. et al. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 60, n. 6, p. 1086-1095, Dec. 2011.

ESPINDOLA, D. L. P. **Tratamento de sementes com fosfito de manganês e enxofre**: efeitos na soja e no desenvolvimento de fitopatógenos. 2015. 51 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GODOY, C. V. et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berne, v. 104, n. 4, p. 336-345, July 1997.

HALL, R. **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: APS, 1991. 120 p.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco-leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950. 34 p. (California Agricultural Experimental Station Circular, 347).

HOSSAIN, M. A.; UDDIN, S. N. Mechanisms of waterlogging tolerance in wheat: morphological and metabolic adaptations under hypoxia or anoxia. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1094-1101, 2011.

KRISHNAN, H. B.; KUO, C. L.; PUEPPKE, S. G. Elaboration of flavonoid-induced proteins by the nitrogenase-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* is regulated by both nodD1 and nodD2, and is dependent on the cultivar-specificity locus, nolXWBTUV. **Microbiology**, New York, v. 141, p. 2245-2251, 1995.

- LIM, S. et al. Proteomics analysis suggests broad functional changes in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action against *Phytophthora infestans*. **Journal of Proteomics**, New York, v. 93, p. 207-223, Nov. 2013.
- LOBATO, M. C. et al. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 122, p. 349-358, 2008.
- MACHADO, J. C. et al. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 1-24, 2012.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MANDAL, S.; MALLICK, N.; MITRA, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 47, p. 642-649, 2009.
- MERCANTE, F. A.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies de leguminosa e rizóbio. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, Rio de Janeiro, v. 22, p. 65-81, 2002.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, p. 126-130, 1995.
- NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, 2001.
- RAES, J. et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, 2003.
- REY, M. S. et al. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2009.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1994. 300 p.

SILVA, J. L. et al. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, n. 8, p. 243-253, Feb. 2015.

TOLEDO-SOUZA, E. D. et al. Interações entre *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Rhizoctonia solani* na severidade da podridão radicular do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 1, p. 13-17, 2009.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 40, n. 5, p. 779-784, 1965.