

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

ROMÁRIO GUIMARÃES VERÇOSA DE ARAÚJO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM *Phaseolus lunatus* POR
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO**

Rio Largo – AL
2021

ROMÁRIO GUIMARÃES VERÇOSA DE ARAÚJO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM *Phaseolus lunatus* POR
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO**

Dissertação de Mestrado entregue ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial obrigatório para obtenção do título de mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior.

Rio Largo - AL

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

A663i Araújo, Romário Guimarães Verçosa de
Indução de resistência à antracnose em *Phaseolus lunatus* por
bactérias fixadoras de nitrogênio. / Romário Guimarães Verçosa de Araújo
– 2021.
63 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) – Universidade
Federal de Alagoas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias. Rio
Largo, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior

Inclui bibliografia

1. Controle biológico. 2. Antracnose. 3. Resistência inata. I. Título.

CDU 632.937

ROMÁRIO GUIMARÃES VERÇOSA DE ARAÚJO

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM *Phaseolus lunatus* POR BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Dissertação submetida ao corpo docente do
Programa de Pós-Graduação em Proteção de
Plantas do Campus de Engenharias e Ciências
Agrárias da Universidade Federal de Alagoas e
aprovada em 06 de julho de 2021.



Documento assinado digitalmente
Gildemberg Amorim Leal Junior
Data: 08/07/2021 08:19:14-0300
CPF: 261.224.578-25
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior – Orientador
CECA/UFAL

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Maria de Fátima Silva Muniz – Membro interno
CECA/UFAL



Documento assinado digitalmente
Tania Marta Carvalho dos Santos
Data: 08/07/2021 09:45:05-0300
CPF: 110.008.178-06
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Prof.^a Dra. Tania Marta Carvalho dos Santos – Membro externo
CECA/UFAL

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Josemildo Verçosa de Araújo (*in memoriam*) e Maria das Graças Guimarães de Araújo;

Ao meu irmão, Josemildo Verçosa de Araújo Júnior;

Ao meu sobrinho Gustavo Verçosa de Araújo;

A minha namorada, Aline Evelle da Silva Lima.

Por todo amor, incentivo, confiança depositada e palavras de carinho. Sem vocês, eu não teria conseguido. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus supremo arquiteto do Universo por toda graça alcançada;

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realização dessa pós-graduação;

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa durante todo o período da minha pós-graduação;

Ao professor Gildemberg Amorim Leal Júnior por toda confiança, orientação, ensinamentos e acessibilidade;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, em especial a Sarah Jacqueline Cavalcanti da Silva, coordenadora do curso, agradeço por sua dedicação ao cargo que ocupa;

Aos que fazem parte da Clínica Fitossanitária (CECA/UFAL), em especial a Professora Maria de Fátima Silva Muniz, Alverlan da Silva Araújo, Ana Caroline de Melo Moraes, Thayane Kelly dos Santos e Glauber Santos Pereira. Agradeço a amizade, companheirismo e por toda ajuda durante a condução de minhas pesquisas;

Aos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia (CECA/UFAL), em especial a Professora Tania Marta Carvalho e João Manoel da Silva. Agradeço a amizade, ajuda e a disponibilização de equipamentos;

Aos que fazem parte do Laboratório de Fitopatologia Molecular e Virologia Vegetal (CECA/UFAL), em especial a pós-doutoranda Mayra Machado de Medeiros Ferro por toda ajuda;

A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas (CECA/UFAL), em especial aos amigos Paulo Henrique Tavares Santos Farias, Elmadã Pereira Gonzaga e Emanuelle Almeida da Costa, por toda amizade e parceria durante as disciplinas e pesquisa;

A todos aqueles que não foram citados, mas que contribuíram com meu crescimento profissional e pessoal. Meu muito obrigado!

É sempre a sua vez de fazer a próxima jogada.

Napoleon Hill

RESUMO

Os mecanismos de defesa das plantas são ativados quando desafiados com o agente causal da doença. Os processos de defesa induzidos podem ser de dois tipos: resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR). O SAR é ativado por fatores bióticos e abióticos e o ISR é ativado por micro-organismos presentes na rizosfera. As bactérias fixadoras de nitrogênio são simbioses das raízes que fornecem nitrogênio as leguminosas. A interação envolve a supressão do sistema de defesa da planta, mas há relatos de efeitos associados à indução de resistência a alguns patógenos. Com isso, objetivou-se avaliar a contribuição da simbiose na resistência do *Phaseolus lunatus* à antracnose. Foram isolados rizóbios de nódulos obtidos de infecção espontânea de 19 etnovariedades de *P. lunatus*. As bactérias isoladas foram caracterizadas morfofisiologicamente. Foram selecionados dois isolados rizobiais, sendo uma com alta capacidade nodulífera (CECA R19) e uma com baixa capacidade nodulífera (CECA R01). Os isolados bacterianos foram inoculados em quatro etnovariedades de feijão: F1CGG (alta taxa de nodulação e resistente a antracnose); RTKC (alta taxa de nodulação e suscetível a antracnose); PCGG (baixa taxa de nodulação e resistente a antracnose); FFG (baixa taxa de nodulação e suscetível a antracnose) e comparados com o tratamento controle e o tratamento que constava com adubação nitrogênio mineral (correspondente a 50 kg ha⁻¹ de N). Foi verificado que as plantas inoculadas com os isolados CECA R01, CECA R19 e as plantas adubadas com nitrogênio mineral apresentaram menor severidade da doença aos 3 e 5 dias após a inoculação, além de apresentarem maior biomassa e matéria seca da parte aérea quando comparadas ao tratamento controle. Ao final da avaliação as plantas adubadas com nitrogênio mineral e as inoculadas com os isolados CECA R01 CECA R19 foram classificadas como moderadamente resistentes e as plantas do tratamento controle como altamente suscetíveis.

Palavras-chave: controle biológico; fixação biológica de nitrogênio; antracnose; resistência inata.

ABSTRACT

Plant defense mechanisms are activated when challenged with the causative agent of the disease. Induced defense processes can be of two types: acquired systemic resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR). SAR is activated by biotic and abiotic factors and ISR is activated by microorganisms present in the rhizosphere. Nitrogen-fixing bacteria are symbionts of the roots that supply nitrogen to legumes. The interaction involves the suppression of the plant's defense system, but there are reports of effects associated with the induction of resistance to some pathogens. Thus, the objective was to evaluate the contribution of symbiosis in the resistance of *Phaseolus lunatus* to anthracnose. Rhizobia were isolated from nodules obtained from spontaneous infection of 19 ethnovarieties of *P. lunatus*. The isolated bacteria were morphophysiologicaly characterized. Two rhizobial isolates were selected, one with high nodule potential (CECA R19) and one with low nodule capacity (CECA R01). Bacterial isolates were inoculated into four broad bean ethnovarieties with the following characteristics: F1CGG (high nodulation rate and resistant to anthracnose); RTKC (high nodulation rate and susceptible to anthracnose); PCGG (low nodulation rate and resistant to anthracnose); FFG (low nodulation rate and susceptible to anthracnose) and compared with the control treatment and the treatment where mineral nitrogen was supplied (corresponding to 50 kg ha⁻¹ of N). It was found that plants inoculated with isolates CECA R01, CECA R19 and plants fertilized with mineral nitrogen had lower disease severity at 3 and 5 days after inoculation, in addition to having higher shoot biomass and dry matter when compared to the treatment. control. At the end of the evaluation, the plants fertilized with mineral nitrogen and those inoculated with the isolates CECA R01 CECA R19 were classified as moderately resistant and the plants of the control treatment as highly susceptible.

Keywords: biological control; biological nitrogen fixation; anthracnose; innate resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 HIPÓTESE	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral:.....	14
3.2 Objetivos específicos:	14
4 REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1 Mecanismos de resistência a doenças	15
4.2 Bactérias fixadoras de nitrogênio.....	17
4.3 Feijão-fava	20
4.4 Antracnose	21
5 MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 Local de estudo	23
5.2 Avaliação da nodulação espontânea em etnovarietades de fava	23
5.3 Isolamento das bactérias rizobiais dos nódulos coletados das etnovarietades de fava.....	25
5.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados de bactérias rizobiais	26
5.5 Infectividade e eficiência dos isolados rizobiais	27
5.6 Avaliação da indução de resistência à antracnose.....	28
5.7 Avaliação da severidade da antracnose.....	30
6 RESULTADOS	32
6.1 Avaliação da nodulação espontânea em diferentes etnovarietades de fava.....	32
6.2 Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados rizobiais	34
6.3 Infectividade dos isolados em etnovarietades de <i>P. lunatus</i>	37
6.4 Indução de resistência em <i>P. lunatus</i>	40
7 DISCUSSÃO.....	48
8 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

A resistência de plantas pode ser definida como a capacidade que o vegetal apresenta em evitar ou atrasar a entrada e subsequentemente a atividade infecciosa de um fitopatógeno em seus tecidos. A resposta da planta é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde sua eficiência dependerá da expressão de seus mecanismos em uma sequência lógica, após o contato com o patógeno em potencial, dando início a uma batalha campal, onde o patógeno utiliza de seu arsenal para atacar, e as plantas, utilizam de mecanismos para a defesa (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Os mecanismos de defesa vegetal ativados por agentes bióticos ou abióticos são estruturais ou bioquímicos e podem ser pré ou pós formados. Os patógenos podem evitar ou suprimir os mecanismos de resistência, os quais quando ativados antes do contato com o agente causal, resultam em menor expressão dos sintomas e danos causados pela doença.

Nessa interação da planta com o patógeno, a indução de resistência acontece com o reconhecimento do patógeno que emite o sinal primário ou mensageiro que estimulará a sinalização hormonal. No processo, a planta ativa os genes associados a resposta de defesa resultando em aumento da atividade enzimática, que são importantes para as reações de defesa em regiões afetadas pelo micro-organismo (VAN-LOON; VAN STRIEN, 1999). Os processos de indução de resistência podem ser de dois tipos: resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (ISR), e ambos podem ser ativados por micro-organismos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

No solo, cada grama é colonizado por bilhões de micro-organismos. Porém, a comunidade microbiana nas raízes é muito diferente da presente no solo distante da rizosfera, sugerindo que as plantas são capazes de moldar seu próprio microbioma (BISSELING; DANGL; SCHULZE-LEFERT, 2009). As relações benéficas entre plantas e micro-organismos são frequentes na rizosfera e podem possibilitar a promoção de crescimento vegetal, ou proporcionar a planta a superar estresses bióticos e abióticos. Entre os sistemas biológicos envolvendo plantas e micro-organismos, a simbiose rizóbio-leguminosa tem a maior expressão econômica por fixar biologicamente o nitrogênio em cultivos de importância

econômica, como as do gênero *Glycine* e *Phaseolus*. As bactérias rizobiais estabelecem uma interação simbiótica com leguminosas que introduzem no solo 50 a 70 x 10⁶ toneladas de nitrogênio por ano (HERRIDGE et al., 2008), reduzindo assim o uso de fertilizantes, e suprimindo às plantas da família Fabaceae uma quantidade ideal de nitrogênio, que será utilizada para promover o crescimento vegetal.

Além de oferecer a vantagem da fixação biológica de nutrientes por associação simbiótica, as bactérias rizobiais são consideradas agentes promissores no controle biológico de muitas espécies de fungos, vírus, nematoides e bactérias (ESSALMANI; LAHLOU, 2003). O controle de doenças através da utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* já foi demonstrado como eficiente no controle de agentes causais de doenças de solo *Macrophomina*, *Rhizoctonia* e *Fusarium*. O controle de fitopatógenos através de *Rhizobium* spp. pode acontecer via competição por ferro, competição por nutrientes presentes na rizosfera, produção de antibióticos, ativação de mecanismos de defesa vegetal e promoção de crescimento. Estudos indicam que os fatores de nodulação de *Bradyrhizobium* contribuem com a elicitação da resistência sistêmica do amendoim à *Sclerotium rolfsii* Sacc. (FIGUEREDO et al., 2017).

A espécie de *Phaseolus lunatus* L., conhecido popularmente como feijão-fava ou feijão-de-lima é cultura de pequena escala, mas apresenta grande importância socioeconômica, devido sua rusticidade, podendo a colheita ser prolongada e ser realizada no período seco. No Brasil, a produção de 10.092 toneladas é concentrada na região Nordeste e com um rendimento médio de 433 kg/ha⁻¹ (IBGE, 2017). Os rendimentos médios são considerados baixos e atribuídos ao fato de grande parte da produção deriva da agricultura familiar.

No sistema familiar, o plantio é realizado em consórcio com outras culturas e sem adoção de tecnologia de manejo nutricional; e controle de pragas e doenças. A ocorrência de doenças pode reduzir a produtividade e ocasionar decréscimo do valor comercial dos grãos. Entre as doenças de maior expressão econômica na cultura está a antracnose, ocasionada pelo fungo *Colletotrichum truncatum* Schwein. Os sintomas da doença são observados nas folhas, ramos e vagens. O controle químico é impraticável por não existir nenhum produto químico recomendado para controle dessa doença na cultura da fava (MAPA, 2019).

Considerando a ativação dos mecanismos de defesa das plantas pelas bactérias fixadoras de nitrogênio, objetiva-se avaliar a indução de resistência contra patógenos da parte aérea. Inicialmente serão identificadas a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam etnovarietades de *P. lunatus* e verificar a capacidade em conferir resistência a antracnose, visando facilitar e promover o desenvolvimento da cultura da fava e a aplicação dos isolados das bactérias fixadoras de nitrogênio na produção agrícola.

2 HIPÓTESE

Bactérias fixadoras de nitrogênio induzem resistência à antracnose em *Phaseolus lunatus*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Analisar a eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio em promover resistência à antracnose em *Phaseolus lunatus* causado pelo patógeno *Colletotrichum truncatum*.

3.2 Objetivos específicos:

Analisar a nodulação de bactérias fixadoras de nitrogênio em *P. lunatus*;

Analisar a promoção de crescimento proporcionado por bactérias fixadoras de nitrogênio em *P. lunatus*;

Verificar a indução de resistência por bactérias fixadoras de nitrogênio em *P. lunatus* à antracnose causado pelo patógeno *Colletotrichum truncatum*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Mecanismos de resistência a doenças

Todos os micro-organismos, sejam eles comensalistas, mutualísticos ou patogênicos ao colonizar as plantas para acessar os nutrientes são capazes de evitar ou suprimir a reposta de defesa. Uma vez que os micro-organismos iniciam a colonização dos tecidos vegetais, as plantas devem decidir entre tolerar a sua presença, estabelecer uma simbiose mutualística ou apresentar uma resposta de resistência contra o micro-organismo. O reconhecimento de patógenos pelas plantas pode levar a uma resposta imune robusta e à restrição do crescimento microbiano (THOMS et al., 2021).

A resistência de um hospedeiro pode ser caracterizada como a capacidade do vegetal em evitar ou atrasar a entrada do patógeno; e subsequentemente a atividade do patógeno em seus tecidos. A resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada; e a eficiência dependerá da expressão de mecanismos de defesa em uma sequência lógica, após o contato com o patógeno em potencial, onde será iniciado uma batalha campal, onde o patógeno utiliza de seu arsenal para atacar as plantas, e essas utilizam de mecanismos para defesa (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

Os mecanismos de defesa do vegetal podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré ou pós-formados em relação a tentativa de penetração do micro-organismo no hospedeiro. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e colonização do patógeno, enquanto os mecanismos bioquímicos envolvem substâncias que são capazes de suprimir ou inibir o desenvolvimento do patógeno, ou gerar condições adversas para a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Os mecanismos de defesa bioquímicos pré-formados são moléculas caracterizadas como fenóis, alcalóides, glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases. Os mecanismos pós-formados são as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies ativas de oxigênio. Os mecanismos estruturais de defesa pré-formados são as cutículas e tricomas que atuam como camada protetora; estômatos que contribuem para resistência em função da

quantidade, morfologia, localização e período de abertura; e paredes celulares espessas que contribuem para restrição da colonização do patógeno. Os pós-formados são as papilas, halos, lignificação, glicoproteínas, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses (STANGARLIN et al., 2011).

A suscetibilidade da planta está associada a transposição do mecanismo de defesa pré-formados; e a fuga e supressão dos mecanismos pós-formados pelo patógeno. A indução de resistência é ativação prévia da resposta de defesa por agentes bióticos ou abióticos antes do contato com o agente fitopatogênico. O objetivo é antecipar a atuação do patógeno na fuga ou supressão dos mecanismos de resistência, reduzindo ou suprimindo os danos causados pela doença (VAN-LOON et al., 1998).

Os processos de indução de resistência podem ser de dois tipos: resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (ISR), e ambos podem ser ativados por micro-organismos. Na interação da planta com o patógeno, a indução dos mecanismos de resistência acontece primeiramente pelo reconhecimento do patógeno que emite o sinal primário ou mensageiro que estimulará a sinalização hormonal. A planta ativa os genes ligados à defesa e/ou aumento da atividade enzimática importante para estas reações de defesa em regiões afetadas pelo patógeno (VAN-LOON; VAN STRIEN, 1999).

Os padrões reconhecidos pelas plantas podem ser de amplo espectro ou específicos sendo conhecidos como MAMPS (sigla em inglês para Padrões moleculares associados a micro-organismos) e PAMPS (sigla em inglês para Padrões moleculares associados a patógenos), sendo o reconhecimento um evento chave que ativa o sistema de defesa. O MAMPS funciona como uma estratégia de disfarce, alterando o padrão molecular, de modo a evitar o reconhecimento pela planta. O PAMPS são moléculas associados aos patógenos que apresentam regiões similares que são reconhecidas pela planta e ativa o sistema imune da planta contra agentes patogênicos (CAMARGO, 2018). Outros mecanismos de resistência induzida são promovidos por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, denominado de resistência sistêmica induzida.

4.2 Bactérias fixadoras de nitrogênio

A comunidade microbiana nas raízes é muito diferente do que no solo a granel. Na rizosfera, as plantas são capazes de moldar seu próprio microbioma (BADRI; VIVANCO, 2009; BAIS et al., 2004; BISSELING; DANGL; SCHULZE-LEFERT, 2009), restringindo a grupos específicos entre os bilhões de micro-organismos presentes da diversidade do solo. As relações benéficas entre plantas e micro-organismos são frequentes na rizosfera e podem possibilitar a promoção de crescimento vegetal, ou proporcionar a planta a superar estresses bióticos e abióticos. O potencial metabólico das plantas pode ser apontado como o principal determinante da especificidade do hospedeiro e forma ativa ou passiva das interações simbiótica-hospedeiro. A caracterização da diversidade de metabólitos vegetais, sem dúvidas, releva o papel que esses compostos desempenham em como as plantas selecionam os micro-organismos benéficos enquanto restringem os patógenos (THOMS et al., 2021).

As plantas têm o potencial de rastrear e selecionar associações simbióticas específicas por meio de metabólitos centrais e especializados, secretando nutrientes que apenas alguns micro-organismos podem utilizar, secretando compostos antimicrobianos que são tóxicos para alguns, mas não todos os micro-organismos, e sinais que atraem micro-organismos específicos. Nutrientes complexos ou específicos da espécie podem desempenhar um papel na seleção de micróbios altamente adaptados e podem contribuir para a especificidade do hospedeiro em associações simbióticas (THOMS et al., 2021).

Na natureza, as plantas formam abundantemente associações benéficas com micro-organismos presentes no solo, que são importantes para sua sobrevivência (ZAMIOUDIS; PIETERSE, 2002). Os fungos micorrízicos auxiliam na absorção de água e nutrientes. As rizobactérias promotoras de crescimento promovem o crescimento e a resistência das plantas a estresse biótico e abiótico. As bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico do gênero *Rhizobium* associadas às plantas da família Fabaceae fornecem o nitrogênio necessário para o desenvolvimento da planta. Nas interações rizóbio-leguminosa, as plantas reconhecem sinais químicos microbianos específicos, o que leva a simbiose mutualística (THOMS et al., 2021).

A simbiose rizóbio-leguminosa é a interação de maior expressão econômica, com aplicabilidade rotineira em culturas de grande importância como a soja, *Glycine max* (L.)

Merr. As bactérias rizobiais estabelecem uma interação simbiótica com leguminosas fixando no solo de 50 a 70 × 10⁶ toneladas de nitrogênio atmosférico por ano (HERRIDGE et al., 2008), reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados. Além de oferecer a vantagem da fixação biológica de nutrientes por associação simbiótica, as bactérias do gênero *Rhizobium* spp. são consideradas agentes promissores no controle biológico de muitas espécies de fungos, vírus, nematoides e bactérias (ESSALMANI; LAHLOU, 2003) e como promotoras de crescimento vegetal (ULLAH et al., 2017).

A simbiose rizóbio-leguminosa inicia quando o rizóbio secreta lipocitooligossacarídeos (LCOs), denominado fatores Nod, que consistem em um esqueleto de quitina de cadeia curta com diferentes substituições (D'HAENZE et al., 2002). Muitas leguminosas têm múltiplos receptores LysM que são necessários para reconhecer o fator Nod correto e, em alguns casos, regular vias de sinalização paralelas (THOMS et al., 2021).

O controle de doenças de plantas através da utilização de espécies *Rhizobium* já foi demonstrado em algumas culturas. Isolados de *Rhizobium* que apresentam atividade antagônica a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (ARFAOUI et al., 2006), agente causal da murcha de fusário em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). As espécies de *R. leguminosarum*, *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum* tem apresentado resultados satisfatórios no controle de fungos fitopatogênicos dos gêneros *Macrophomina*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* (EHTESHAMUL-HAQUE; GHAFAR, 1993; ÖZKOÇ; DELIVELI, 2001).

Os fatores Nod de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 contribuem com a elicitação da resistência sistêmica do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) à *Sclerotium rolfsii*. O mutante derivado da estirpe SEMIA6144 (V2) é incapaz de produzir os fatores de nodulação e plantas colonizadas pela estirpe apresentou maior incidência de doença e menor peso seco na parte aérea em comparação com as plantas colonizadas pela estirpe selvagem. A diminuição da resposta de defesa contra *S. rolfsii* em plantas inoculadas com a cepa incapaz de sintetizar os fatores Nod, indica um papel para essas moléculas na indução de ISR (FIGUEREDO et al., 2017). Mutantes de *Medicago truncatula*, incapazes de perceber os fatores Nod, são mais suscetíveis aos patógenos *Aphanomyces auteiches* e *Colletotrichum trifolii* do que plantas selvagens (REY et al., 2013).

O controle de fitopatógenos através de *Rhizobium* spp. acontece via vários mecanismos de ação (ARFAOUI et al., 2006): competição por ferro (CARRILLO; VAZQUEZ, 1992); competição por nutrientes presentes na rizosfera (ESSALMANI; LAHLOU, 2003); produção de antibióticos (EHTESHAMUL-HAQUE; GHAFAR, 1993); ativação de mecanismos de defesa da planta; promoção de crescimento vegetal que proporciona à planta maior capacidade de suportar ataque de fatores bióticos e abióticos.

Estima-se que o gênero *Phaseolus*, pertencente à família Fabaceae, contenha cerca de 70 espécies, a maior diversidade sendo encontrada no Norte do México à América Central (DELGADOS-SALINAS, 2006), sugerindo que o centro de origem do gênero *Phaseolus* seja nessa região (SERVÍN-GARCIDUEÑAS et al., 2014). A diversidade dos simbiontes naturais de *Phaseolus* apresentam especificidade e compreende a oito clados filogenéticos nomeados a partir de espécies representativas de cada grupo (*P. filiformis*, *P. leptostachyus*, *P. lunatus*, *P. pauciflorus*, *P. polystachyus*, *P. tuerckheimii* e *P. vulgaris*). Além da eficiência da espécie em solubilizar nitrogênio, deve-se levar em consideração a sua capacidade de fixação biológica na espécie alvo.

O conhecimento dos simbiontes específicos para diferentes espécies do gênero *Phaseolus* é de extrema importância para os agricultores aumentarem o rendimento das culturas, visando a utilização de bactérias fixadoras em fertilizantes naturais (SERVÍN-GARCIDUEÑAS et al., 2014). O feijão domesticado *P. vulgaris* é nodulado por *R. etli*, *R. phaseoli*, e outras espécies relacionadas. Quando *P. vulgaris* foi utilizado como armadilha em florestas de solo rico em *Bradyrhizobium*, não capturou nenhuma cepa bradirrizobial (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012), confirmando assim a especificidade existente entre o gênero *Phaseolus* e os seus simbiontes.

Estudos filogenéticos de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas do gênero *Phaseolus*, propuseram que a nodulação proporcionada por *Bradyrhizobium* é comum em todo o gênero e o que houve foi uma mudança de preferência simbionte para a nodulação proporcionada por *Rhizobium* em poucas espécies relacionadas. Os autores constataram a presença de espécie de *Bradyrhizobium* em plantas de *P. lunatus* nativas do México (SERVÍN-GARCIDUEÑAS et al., 2012).

4.3 Feijão-fava

P. lunatus é uma planta conhecida popularmente como feijão-fava ou feijão-de-lima, que pertence ao filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, gênero *Phaseolus* e espécie *P. lunatus* (CRONQUIST, 1988). A cultura apresenta uma grande importância socioeconômica, devido à sua rusticidade, tendo colheita prolongada e realizada no período seco, o que favorece seu cultivo na região Nordeste (AZEVEDO et al., 2003). As variedades de feijão-fava apresentam dois hábitos de crescimento: o determinado, que se caracteriza pelo desenvolvimento completo da gema terminal em uma inflorescência; e o indeterminado, que se caracteriza pelo desenvolvimento da gema terminal em uma guia (SANTOS et al., 2002).

No Brasil, é cultivada em todos os estados e apresenta uma capacidade de adaptação mais ampla que o feijão-comum (*P. vulgaris* L.), e o seu cultivo apresenta grande relevância, sendo utilizada na gastronomia nordestina e na alimentação de indígenas como fonte proteica em épocas de escassez de carne. Acredita-se que as principais razões para o cultivo limitado estejam associadas à maior tradição no consumo de feijão-comum, ao paladar do feijão-fava e ao tempo de cocção mais longo (GUIMARÃES et al., 2007).

No ano de 2017 o Brasil teve uma produção de 10.092 toneladas numa área plantada de 24.709 hectares, tendo um rendimento médio de 433 kg/ha⁻¹, movimentando um valor de R\$ 65.277.000,00. O estado do Ceará é o maior produtor do país, com uma produção de 3.596 toneladas, correspondente 35,63% da safra nacional. Alagoas ocupa a penúltima posição no ranking dos estados produtores da região nordeste e a quarta menor produção a nível nacional, com um total de 417 toneladas, o que representa apenas 4,31% de toda safra brasileira (IBGE, 2017).

A baixa produtividade e a escassez de produção em alguns estados do Brasil podem ser atribuídas ao fato de que grande parte da produção ser oriunda de pequenos produtores que plantam em consórcio com outras culturas, sem adoção de tecnologia e manejo que visem o aumento da produtividade. A ocorrência de doenças também tem sido apontada como um dos fatores para as baixas produtividades e qualidade da fava produzida (SANTOS et al., 2002).

As doenças de maior expressão econômica na cultura da fava são: as nematoses causadas pelo gênero *Meloidogyne* que provocam redução considerável na produção, as viroses (*Bean Golden mosaic vírus*), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*); podridão radicular (*F. solani* f. sp. *phaseoli*), míldio (*Phytophthora phaseoli*), crestamento bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*), murcha vascular (*F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*) e antracnose (*C. truncatum*) (BRINK; BELAY, 2006).

4.4 Antracnose

O gênero *Colletotrichum* pertencente ao filo Ascomycota, família Glomerellaceae, possui como forma teleomórfica *Glomerella* spp. descritos por Corda em 1831, sendo relatado como um fungo que produz frutificações setosas, denominadas acérvulos, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa de coloração alaranjada ou creme (MENEZES, 2006). Atualmente, as espécies de *Colletotrichum* são agrupadas em complexos e a sistemática é baseada em marcadores moleculares (HYDE et al., 2009). Nesse gênero são encontradas formas saprofíticas e patogênicas, sendo esta última responsável por doenças de grande importância econômica, comumente denominadas de antracnoses, ocorrendo em uma ampla gama de hospedeiros (MENEZES et al., 2006).

A antracnose é uma doença que provoca prejuízos de bilhões de dólares em diversas culturas agrícolas como: pimentas picantes, por espécies *C. frutescences* L. (LAKSHMESHIA et al., 2005) e *C. chinense* Jacq. (MCGOVERN, 1995); berinjela por *C. gloeosporioides* (FERNANDES et al., 2002); tomate por *C. coccodes* (BYRNE et al., 1998); em leguminosas por *C. lindemuthianum*; em bananeira por *C. musae* (GOES, 2013). Outras espécies como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* provocam a doença em diversas famílias de hospedeiros (MENEZES, 2006).

Em feijão-fava a doença já foi relatada sendo ocasionada pelas espécies *C. sichuanensis*, *C. brevisporum*, *C. lobatum*, *C. plurivorum*, *C. musicola* (CAVALCANTE et al., 2018). No Brasil, *C. dematium* f. sp. *truncata* já foi relatado ocasionando antracnose na cultura (PAULA JÚNIOR et al., 1995), e recentemente três espécies ocasionaram a doença no nordeste brasileiro: *C. plurivorum* (CAVALCANTE et al., 2018), *C. clivae* e *C. fruticola*

(SOUSA et al., 2017). Predominantemente em feijão-fava a doença é ocasionada pela espécie *C. truncatum*, que de acordo com sua caracterização morfológica apresentam conídios hialinos, unicelulares, com formato falcado, ápices afilados e dispostos em acérvulos com setas asseptadas de coloração marrom escuro. O tamanho dos conídios varia de 18,31–26,63 µm para o comprimento e 2,01–4,06 µm para a largura (CARVALHO, 2009).

Outros hospedeiros de *C. truncatum* são *Glycine max* (COSTA et al., 2009), *P. vulgaris* L. (RODRIGUES et al., 2002), *Capsicum* spp. (TOZZE JÚNIOR et al., 2006), *Mangifera indica* L. (SERRA et al., 2011), *Passiflora edulis* Sims (SOLINO et al., 2012). O fungo tem sua colonização predominante nas regiões do nordeste brasileiro, onde encontra condições favoráveis para seu desenvolvimento, devido as condições de elevada umidade e temperatura (SILVA et al., 2013).

A doença na cultura da fava atinge as folhas, ramos e vagens, podendo ocasionar redução de produtividade e decréscimo do valor comercial dos grãos. Os principais sintomas são lesões deprimidas nas vagens, de coloração marrom escura. Nas folhas são observadas lesões avermelhadas, inicialmente nas nervuras da parte inferior seguido de necrose do limbo, tanto nas faces adaxial quando na abaxial. Hastes, pecíolos jovens e hipocótilo também podem apresentar lesões avermelhadas e deprimidas (PAULA JÚNIOR et al., 1995).

O controle químico é ausente pela inexistência de fungicidas registrados para a doença (MAPA, 2019). Algumas medidas durante a condução da cultura são recomendadas visando a redução da doença, como rotação de cultura, plantio distante de plantações com a presença do patógeno, uso de cultivares precoces, controle de épocas, densidade de plantio e utilização de sementes registradas e sadias (SPONHOLZ et al., 2006; HENNING et al., 2014).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microscopia e Biologia Molecular do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA – UFAL), localizado em Rio Largo, Alagoas.

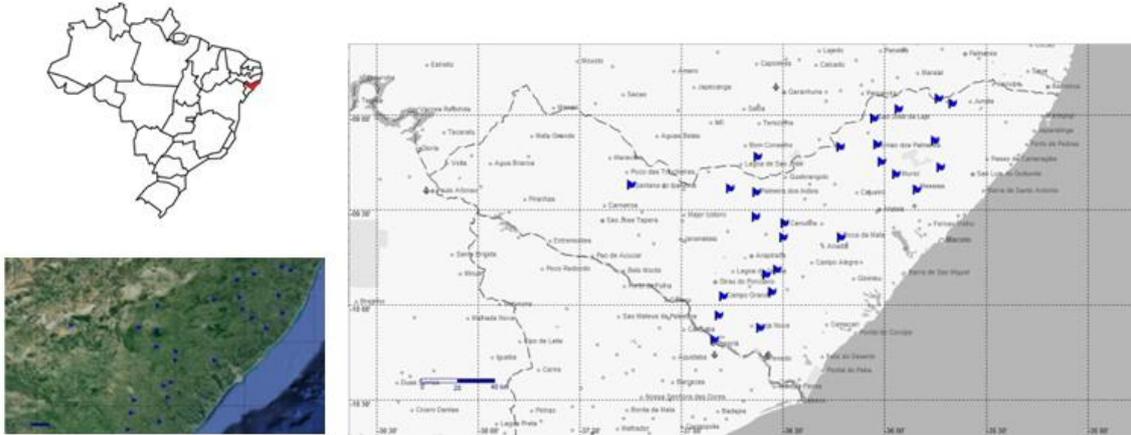
5.2 Avaliação da nodulação espontânea em etnovariedades de fava

A nodulação espontânea foi avaliada em 21 etnovariedades de fava (Tabela 1). As variedades compõem a coleção de etnovariedades coletadas em municípios da Mesorregião do Agreste Alagoano e da Mesorregião do Leste Alagoano (Figura 1) com registro de dados estatístico da produção de feijão-fava (IBGE, 2017).

Tabela 1. Lista com o código das 21 etnovariedades utilizadas para isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio com a indicação do nome popular, cidade de origem e coordenadas dos municípios.

Código	Nome popular	Local de coleta	Coordenadas	
			Longitude	Latitude
BBN	Branca			
RBN	Rajada	Branquinha	36° 0'44.69"O	9°14'52.39"S
RBA	Rajadinha			
BCGG	Branca			
F1CGG	Fava 1			
F2CGG	Fava 2	Campo Grande	36°47'32.71"O	9°57'25.98"S
PCGG	Pintadinha			
FCGNI	Fígado			
BTJC	Branca			
BTL	Branca			
CTL	Coquinho			
RTKC	Rama	Taquarana	36°29'44.17"O	9°38'45.55"S
STL	Sura			
FAM	Fava	Arapiraca	36°34'46.63"O	9°50'35.25"S
FIJ	Fava	Igaci	36°37'57.91"O	9°32'23.16"S
FFG	Favita	Flexeiras	35°43'25.34"O	9°16'39.33"S
OPBJJ	Olho-de-peixe	Belém	36°29'26.86"O	9°34'24.84"S
RJV	Rama	Junqueiro	36°31'34.91"O	9°49'3.65"S
RJM	Rasteira			
RSSM	Rama	São Sebastião	36°33'8.86"O	9°56'0.26"S
SSSJ	Sura			

Figura 1. Localização do estado de Alagoas no mapa de Brasil e dos municípios do estado onde foram realizadas as coletas das etnovarietades de feva.



Fonte: (SOARES, 2019)

A avaliação da nodulação espontânea nas etnovarietades foi conduzida com plantas cultivadas em vasos (1L) contendo o solo retirado da camada arável (0 a 30 cm). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado contendo 21 tratamentos e três repetições, totalizando 63 parcelas experimentais. Em cada vaso foram semeadas três sementes, quinze dias após a germinação foi realizado o desbaste, deixando uma planta por vaso.

Aos 60 dias após o plantio, foi realizada a avaliação da nodulação natural. As plantas foram retiradas dos vasos com cuidado para não fragmentar o sistema radicular. As raízes foram lavadas cuidadosamente para retirada do solo aderido (Figura 2). Os nódulos foram destacados das raízes e em seguida contados e pesados (massa fresca). Alguns nódulos foram destacados do sistema radicular deixando 0,5 cm de raiz para utilizar no isolamento das bactérias rizobiais. Alguns nódulos foram cortados transversalmente para visualização da coloração avermelhada determinada pela presença da leg-hemoglobina, indicativo de nódulos ativos.

Os demais nódulos foram acondicionados em sacos de papel Kraft e desidratados a 65° C por 48 horas em estufa com ventilação forçada até peso constante. Os nódulos secos

foram pesados em balança analítica para a determinação da massa seca. As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas através do teste de Scott-Knott sob nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Assistat. Os gráficos foram construídos utilizando o software SigmaPlot.

Figura 2. Plântulas (A) e plantas desenvolvidas com 60 dias (B), sistema radicular após retirada do solo (C) e lavagem das raízes (D) e coleta de nódulos (E) para contagem no número total de nódulos por planta avaliação da nodulação natural das etnovarietades de *P. lunatus*.



Fonte: (AUTOR, 2019)

5.3 Isolamento das bactérias rizobiais dos nódulos coletados das etnovarietades de fava

O isolamento das bactérias presentes no rizóbios foram realizados dos nódulos coletados com os fragmentos de raiz aderidos a raiz (0,5 cm). A presença do fragmento facilita a manipulação do nódulo e diminui a chance de danificá-lo durante o isolamento. Os nódulos foram lavados em água, com cuidado, sobre uma peneira de malha 2,0 mm.

Em capela de fluxo laminar, os nódulos foram reidratados em placa de Petri contendo água por 30 minutos, e em seguida foram imersos por um período de 5 a 10 segundos em álcool 90-95% para quebrar a tensão superficial e remoção das bolhas de ar do tecido. Os nódulos foram transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 5% para assepsia e realizada a tríplice lavagem em água destilada, aproveitando a água da última lavagem para macerar os nódulos, com o auxílio de um bastão de vidro. A suspensão do macerado foi semeada formando estrias em meio extrato de levedura-manitol-ágar (YMA) acrescido do corante vermelho congo, para auxiliar no processo de identificação de contaminantes, que em geral absorvem a coloração vermelha. As placas inoculadas foram incubadas entre 25 e 30°C

(DIONISIO et al., 2016) até o aparecimento de colônias isoladas. As colônias crescidas sem a presença de contaminantes foram repicadas em meio YMA em cultivos sucessivos até a obtenção de culturas isoladas e puras.

5.4 Caracterização morfofisiológica dos isolados de bactérias rizobiais

Os isolados rizobiais puros obtidos do isolamento dos nódulos das etnovarietades foram caracterizadas fenotipicamente baseadas em características morfológica e fisiológicas desenvolvidas em meio de cultivos YMA contendo os corantes vermelho congo ou azul de bromotimol. A avaliação em meio contendo o corante vermelho congo serviu para diferenciar isolados bacterianos rizobiais de isolados bacterianos não rizobiais. A avaliação em meio contendo azul de bromotimol serviu para verificar acidificação do meio pelos isolados devido a metabolização do manitol como fonte de carbono (HUNGRIA; SILVA, 2011).

As características analisadas em meio YMA contendo o corante vermelho congo foram a manifestação de crescimento (rápido, lento, intermediário e muito lento), o tamanho do diâmetro colônias com o auxílio de microscópio óptico, a forma da colônia (circular, irregular, puntiforme), a elevação da colônia (plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada, umblicada), o tipo de borda da colônia (inteira, ondulada, lobada, denteada, filamentosa); o tipo de superfície (lisa, rugosa ou papilada), produção de muco (escassa, pouca, moderada ou abundante), consistência da colônia (seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butírica), detalhes ópticos (transparente, translúcida ou opaca) e cromogênese (coloração apresentada devido a metabolização do corante). As características analisadas em meio YMA contendo o corante azul de bromotimol foram alteração do pH do meio (ácido, neutro ou alcalino) e a cromogênese (HUNGRIA; SILVA, 2011).

O teste de coloração de Gram (1884) foi realizado para a classificação dos isolados bacterianos em gram-positivos (G+) ou gram-negativos (G-). Todas as bactérias isoladas de nódulos radiculares foram inoculadas em meio YMA, e, após o crescimento foi realizado o esfregaço em lâminas de vidro com auxílio de uma alça de platina e fixados através de calor, com o auxílio de uma lamparina. Posteriormente, foram tratadas com os reagentes cristal violeta a 1%, por um minuto; lugol, por um minuto; álcool 70%, por 30 segundos; e safranina, por 30 segundos. Em cada etapa da coloração, as lâminas foram lavadas com água corrente e

secadas cuidadosamente com papel toalha, sendo ao final possível visualizar com o auxílio do óleo de imersão, as colônias bacterianas em microscópio óptico.

5.5 Infectividade e eficiência dos isolados rizobiais

A capacidade dos isolados rizobiais em induzir a formação de nódulo e promover o crescimento foi avaliada numa etnovarietal de fava com baixa capacidade de formação de nódulos (RJM), levando em consideração o ensaio de nodulação espontânea em etnovarietais de fava. O ensaio foi conduzido com plantas germinadas a partir de sementes previamente desinfestadas. A desinfecção foi realizada imergindo as sementes por três minutos em etanol 70%, dez minutos em hipoclorito de sódio 5% e realizado dez lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada (ZILLI et al., 2011). Posteriormente, as sementes foram acondicionadas em caixa para germinação forradas com algodão e, após quatro dias, as plântulas foram transplantadas para vasos (1,5 L) contendo solo autoclavado. A irrigação das plantas foi realizada diariamente com água autoclavada, visando impedir qualquer fonte de inóculo de bactéria rizobiais veiculada por água de irrigação, evitando a nodulação espontânea.

No sexto dia após o transplante das plântulas, foi realizada a inoculação das plantas com os isolados rizobiais (ZILLI et al., 2011). O inóculo foi preparado a partir dos cultivos das bactérias em meio YM mantidos sob agitação por 96 horas à 20°C. A partir do cultivo foi preparado um inóculo contendo 6×10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro, com o auxílio para quantificação de espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-22). A inoculação foi realizada com a aplicação de 1 mL da suspensão no solo próximo do colo da plântula (Figura 3). O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, contendo 20 tratamentos (19 isolados bacterianos e um tratamento controle) e três repetições, totalizando 60 parcelas experimentais.

Figura 3. Procedimento de inoculação da suspensão dos isolados rizobiais na região do colo das plântulas da etnovarietade de fava RJM



Fonte: (AUTOR, 2019)

A avaliação do experimento foi realizada aos 60 dias após a inoculação das plantas com os isolados rizobiais. As plantas foram avaliadas quanto ao número de nódulos presente nas raízes (NN) e quanto a produção de massa fresca (MFPA) e seca da parte aérea (MSPA) e peso fresco (PFSR) e seco do sistema radicular (PSSR). A massa fresca e seca da parte aérea e raízes foram determinadas por pesagem. Após a pesagem da massa fresca, estas foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e secas em estufa com ventilação de ar forçada à 65°C por 48 horas até atingir peso constante. As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas através do teste de Scott Knott. Os gráficos foram construídos utilizando o programa SigmaPlot.

5.6 Avaliação da indução de resistência à antracnose

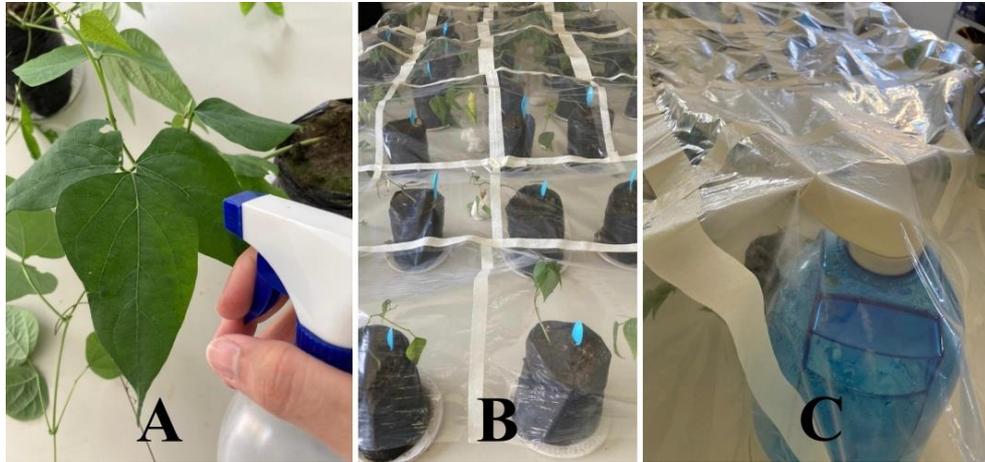
A indução de resistência foi estudada com dois isolados rizobiais contrastante para a capacidade de induzir a formação de nódulos, alta e baixa. O ensaio foi conduzido com quatro etnovarietades de *P. lunatus* sendo duas resistentes (F1CGG e PCGG) e duas suscetíveis (RTKC e FFG) ao isolado ICT12 de *C. truncatum* (SOARES, 2019). Caracterizadas pela alta (F1CGG e RTKC) e baixa (PCGG e FFG) capacidade de produzir nódulos.

Os ensaios foram conduzidos com plantas obtidas de sementes previamente desinfestadas (ZILLI et al., 2011). As sementes foram pré-germinadas em caixas para

germinação forrados com algodão. Após quatro dias, as sementes germinadas foram transplantadas para vasos de 2,5 L contendo solo autoclavado. A irrigação foi realizada diariamente com água autoclavada. No sexto dia após o transplante, foi realizada a inoculação das plântulas com os isolados rizobiais, aplicando por plântula 1 ml do inoculante contendo 6×10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (ZILLI et al., 2011).

O desafio das plantas com o isolado ICT12 de *C. truncatum* aconteceu aos 60 dias após o transplante. A suspensão de conídios foi preparada a partir de cultivos do fungo em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar a 2%) com sete dias. Ao cultivo foi adicionado 20 mL de água destilada e esterilizada (ADE) e as estruturas reprodutivas do patógeno foram desagregadas do meio de cultivo através da raspagem das placas com alça de platina. Os esporos foram separados dos fragmentos de hifas após filtragem da suspensão através de uma dupla camada de gaze. A concentração de esporos foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer (Henneberg-Sander GmbH, Alemanha, Giessen-Lutzellinden). A concentração de esporos da suspensão foi ajustada por diluição para 10^6 esporos ml^{-1} (ALFENAS; FERREIRA, 2007). Antes de realizar a inoculação, a taxa de esporulação foi verificada previamente com uma alíquota da suspensão de esporos foi inoculada em placa de Petri contendo BDA para verificar a germinação monospórica. A suspensão de conídios contendo espalhante adesivo Tween ® (0,1%) foi pulverizada em toda a parte aérea das plantas. As plantas foram mantidas em câmara úmida montada com lona plástica transparente e um umidificador (Reli On, em baixa intensidade). O umidificador foi acionado por 1 hora por cinco vezes durante o dia (Figura 4). No tratamento controle pulverizado foi água destilada autoclavada e espalhante adesivo.

Figura 4. Inoculação de *Colletotrichum truncatum* nas folhas das etnovarietades de fava (A); câmara úmida onde as plantas foram mantidas (B) umidificador acionado para manter a umidade do ambiente (C)



Fonte: (AUTOR, 2019)

O experimento foi realizado em casa de vegetação, em esquema fatorial 4 x 4, onde o primeiro fator corresponde aos isolados bacterianos (dois), um tratamento controle (sem inoculação de bactérias rizobiais) e um tratamento adicional (no qual as plantas foram nutridas com nitrogênio mineral, correspondente a 50 kg ha⁻¹ de N), e o segundo fator correspondente a quantidade de etnovarietades de feijão-fava. Os tratamentos foram representados por 5 repetições, totalizando 80 parcelas experimentais.

A avaliação dos sintomas provocados pela inoculação com o isolado ICT12 foi realizada aos três e cinco dias após a inoculação. Em seguida, as plantas foram coletadas para avaliação dos parâmetros biométricos como matéria fresca e seca da parte aérea, a fim de verificar se houve promoção de crescimento pelas bactérias rizobiais. As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas através do teste de Scott-Knott. Os gráficos foram construídos utilizando o programa SigmaPlot.

5.7 Avaliação da severidade da antracnose

As avaliações da severidade de antracnose, foram realizadas no 3º e 5º dia após o desafio das plantas com esporos do isolado ICT12 de *C. truncatum*. A avaliação do comprometimento da área foliar foi realizada com o auxílio do software Quant v. 1.0.2. O

programa determina a porcentagem da área foliar lesionada através de escaneamento. A quantificação acontece através da diferenciação da coloração da área foliar sem sintomas e da área foliar com sintomas através da contagem no número de pixels convertidos em porcentagem. A porcentagem da área foliar com sintomas foram utilizadas para o agrupamento dos tratamentos em escala de notas para antracnose (CARVALHO, 2009), quando: 0, indica ausência de sintomas; 1, traços a 10% da área foliar infectada; 2, de 11 a 25% da área foliar infectada; 3 de 26 a 50% da área foliar infectada, sem queda de folíolo; 4 de 51 a 75% da área foliar infectada, sem ou com queda de um dos folíolos; 5 de 76 a 100% da área foliar infectada, sem ou com queda de dois ou três folíolos.

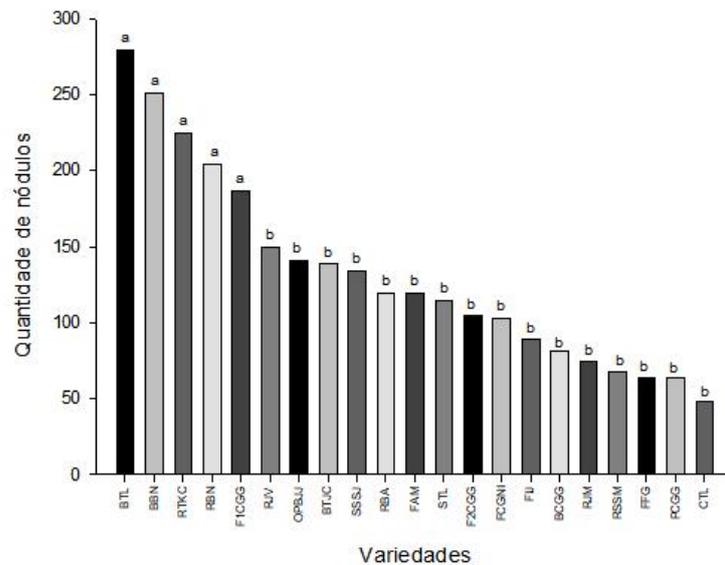
A partir das médias estimadas pela escala de notas, a reação das etnovariedades de fava inoculadas pelos isolados rizobiais foram agrupadas em cinco classes de acordo com a resposta ao patógeno: imune (IM) – 0; altamente resistente (AR) – 0,1 a 1,4; moderadamente resistente (MR) – 1,5 a 2,4; moderadamente suscetível (MS) – 2,5 a 3,0; e altamente suscetível (AS) – acima de 3,0 (BELMINO, 2004). As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANAVA) e as médias comparadas através do teste de Scott-Knott. Os gráficos foram construídos utilizando o software SigmaPlot.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da nodulação espontânea em diferentes etnovariedades de fava

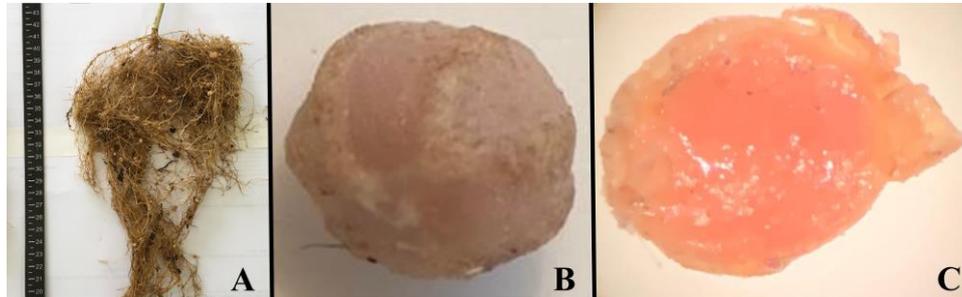
O padrão de nodulação natural apresentado pelas etnovariedades permitiu diferenciar as variedades em dois grupos de acordo com teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. O número de nódulos por plantas formados por infecção espontânea variou de 48 a 278 entre as etnovariedades. A variedade BTL apresentou a maior média de nódulos sem diferenciar das variedades BBN, RTKC, RBN, FICGG. As demais variedades apresentaram um menor número de nódulos (149 a 48 nódulos), a variedade com menor taxa de nodulação foi a CTL (Figura 5). A viabilidade do nódulo foi verificada pela coleta aleatória de alguns nódulos de cada variedade. Os cortes transversais dos nódulos revelaram a presença de uma coloração interna rósea evidenciando a presença de leg-hemoglobina, que indica que as bactérias rizobiais encontram-se ativas no nódulo (Figura 6).

Figura 5. Média do número de nódulos por planta de diferentes etnovariedades de feijão-fava infectadas espontaneamente por bactérias rizobiais presentes no solo. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



Fonte: (AUTOR, 2021)

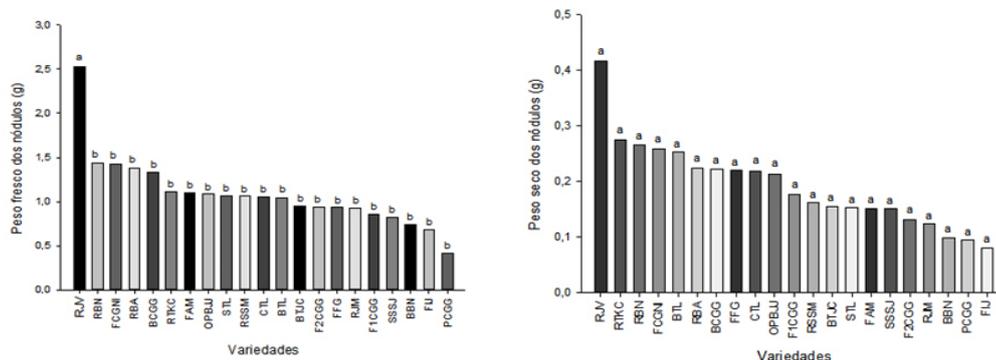
Figura 6. Sistema radicular de uma das plantas coletadas no experimento (A); morfologia do nódulo destacado (B); nódulo cortado transversalmente para visualização da coloração rósea (leg-hemoglobina) que demonstra que o nódulo se encontra ativo.



Fonte: (AUTOR, 2019)

As etnovarietades apresentaram poucas diferenças significativas relacionadas ao peso fresco e seco dos nódulos. O peso fresco variou entre 0,40 e 2,52 gramas e o peso seco variou entre 0,08 a 0,41 gramas. Uma única variedade (RJM) apresentou o peso médio dos nódulos frescos e seco superior à média das demais variedades (Figura 7). O peso fresco médio dos nódulos destacados do genótipo RJV apresentou valores que variaram entre 2,41 e 2,73 gramas. Os valores do peso seco dos nódulos para a variedade RJV variaram entre 0,36 e 0,47. A variedade RJV, apesar de apresentar maior peso fresco de nódulos, não diferenciou das demais variedades no peso seco dos nódulos.

Figura 7. Média do peso fresco e seco dos nódulos coletados em diferentes etnovarietades de feijão-fava infectadas espontaneamente por bactérias rizobiais presentes no solo. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



Fonte: (AUTOR, 2021)

6.2 Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados rizobiais

O isolamento de bactérias a partir dos nódulos formados pela infecção natural de bactérias presentes no solo resultou na obtenção de 19 isolados rizobiais puros. Os rizóbios de cada etnovarietades foram identificados com as iniciais “CECA R” e a numeração, a primeira sigla refere-se ao local da condução da pesquisa, e a letra “R” refere-se a rizóbio (Tabela 2).

Tabela 2. Lista dos isolados rizobiais obtidos no trabalho com indicação dos códigos e referência ao código e nome popular das etnovarietades de origem.

Isolado	Código das etnovarietades	Nome popular
CECA R01	BBN	Branca
CECA R02	RBN	Rajada
CECA R03	RBA	Rajadinha
CECA R04	BCGG	Branca
CECA R05	F1CGG	Fava 1
CECA R06	F2CGG	Fava 2
CECA R07	FCGNI	Fígado
CECA R08	BTJC	Branca
CECA R09	BTL	Branca
CECA R10	CTL	Coquinho
CECA R11	RTKC	Rama
CECA R12	STL	Sura
CECA R13	FAM	Fava
CECA R14	FIJ	Fava
CECA R15	FFG	Favita
CECA R16	OPBJJ	Olho-de-peixe
CECA R17	RJV	Rama
CECA R18	RJM	Rasteira
CECA R19	SSSJ	Sura

O cultivo dos isolados em YMA contendo vermelho congo indicou que a maioria dos isolados bacterianos apresentam crescimento rápido, formando colônias isoladas visíveis ao olho nu em até três dias. Somente 21% dos isolados apresentaram crescimento intermediário (CECA R01, CECA R03, CECA R16 e CECA R18). Os isolados com maior diâmetro das colônias foram CECA R18, CECA R16 e CECA R15. Os isolados com menores diâmetros de colônia foram CECA R05 e CECA R09. O cultivo em meio YMA contendo azul de bromotimol indicou que metade dos isolados não alteraram o pH, o mantendo neutro (52%) e a coloração azul. Os demais isolados acidificaram o meio mudando a cor azul no meio para amarelo. (Tabela 3). Todos os isolados rizobiais apresentaram forma da colônia puntiforme e com a superfície lisa. Os isolados apresentaram elevação da colônia convexa (35%), lenticular (25%), plana (20%) e pulvinada (20%).

Tabela 3. Valores e tipificação dos isolados rizobiais determinados através de parâmetros morfofisiológicos observados em meio de cultivo.

Isolados	MC	TDC (μm)	pH	FC	EC	BC	SC	PM	CMC	DO	CB	CVC	CG
CECA R01	I	21,1 a	N	P	C	I	L	M	G	O	B	B	N
CECA R02	R	6,4 c	A	P	P	I	L	E	G	O	A	A	N
CECA R03	I	20,8 a	N	P	L	I	L	M	G	O	B	Rb	N
CECA R04	R	13,0 b	N	P	C	I	L	M	G	O	B	Rl	N
CECA R05	R	4,9 c	A	P	C	I	L	E	G	O	A	B	N
CECA R06	R	11,8 b	A	P	P	I	L	P	G	O	B	B	N
CECA R07	R	14,2 b	N	P	L	I	L	P	S	O	B	B	N
CECA R08	R	12,2 b	A	P	C	I	L	P	S	O	A	Rb	N
CECA R09	R	5,4 c	A	P	P	I	L	E	S	O	A	B	N
CECA R10	R	15,6 b	N	P	L	I	L	P	G	O	B	Rb	N
CECA R11	R	13,7 b	N	P	P	I	L	M	G	O	A	Rl	N
CECA R12	R	20,3 a	N	P	C	I	L	P	G	O	B	B	N
CECA R13	R	12,2 b	N	P	C	I	L	M	G	O	B	Rl	N
CECA R14	R	22,5 a	A	P	L	I	L	P	G	O	A	Rl	N
CECA R15	R	6,6 c	A	P	C	I	L	E	S	O	A	B	N
CECA R16	I	22,8 a	N	P	P	I	L	P	G	O	B	Rb	N
CECA R17	R	13,4 b	A	P	L	I	L	E	G	O	A	Rl	N
CECA R18	I	26,2 a	A	P	L	I	L	M	G	O	B	B	N
CECA R19	R	14,3 b	N	P	P	I	L	M	G	O	B	Rb	N

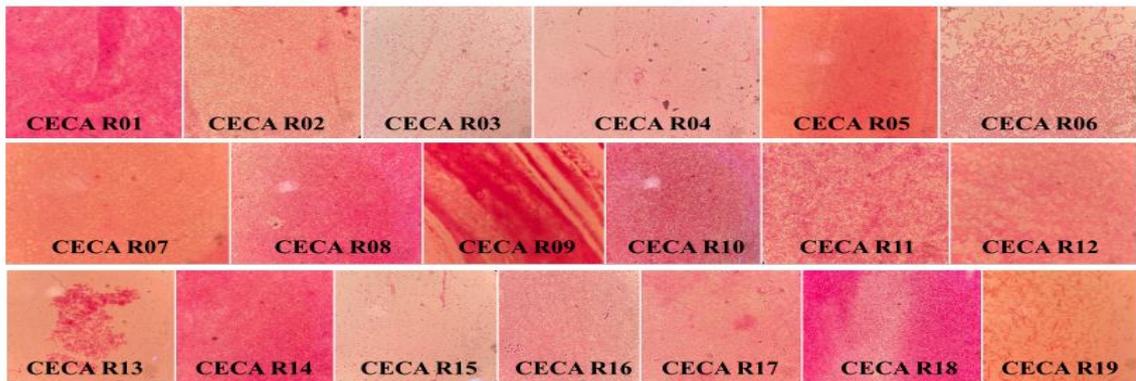
MC = Manifestação de crescimento (R: Rápida, I: Intermediária, L: Lenta); TDC = Tamanho em diâmetro das colônias em μm (Manifestação de crescimento rápido sendo avaliadas no quinto dia e intermediária ao oitavo dia, letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott); pH (A: Ácida, N: Neutro); FC = Forma da colônia (P: Puntiforme); EC = Elevação da colônia (P: Plana, L: Lenticular, C: Convexa); BC (I: Inteira); SC (L: Lisa); PC = Produção de muco (E: Escassa, P = Pouca, M: Moderada); CMC = Consistência da massa de crescimento (S: Seca, G: Gomosa); DO = Detalhes ópticos (O: Opaco); CB = Cromogênese da colônia em meio YMA com indicador Azul de Bromotimol (B: Branco, A: Amarelo); CVC = Cromogênese da colônia em meio YMA com corante Vermelho do Congo (B: Branco, Rl: Rosado levemente, Rb: Rosa bebê, A: Avermelhado); CG = Coloração de Gram (N: Negativo).

Nenhum isolado bacteriano foi caracterizado com a produção abundante de muco. Os isolados apresentaram produção de muco escassa (26%), reduzida (36%) e moderada (36%). A maioria dos isolados rizobiais (78%) apresentaram consistência da massa de crescimento gomosa, os demais isolados apresentaram consistência seca (22%). Todas os isolados rizobiais visualizadas em lupa apresentaram colônias opacas. Os isolados rizobiais apresentaram cromogênese branca (57%) e cromogênese amarela (43%) em meio YMA contendo o corante

azul de bromotimol. Em meio YMA contendo o vermelho do congo, a reação de cromogênese indicou colônias dos isolados com coloração branca (43%), rosa bebê (26%), levemente rosado (26%) e avermelhado (5%). Todos os isolados bacterianos gram-negativos (Figura 8).

Os isolados foram segregados em 3 grupos de acordo com tamanho das colônias. Os rizóbios que apresentaram maior valor médio para tamanho de colônias foram os isolados CECA R01, CECA R03, CECA R12, CECA R14, CECA R16 e CECA R18. Os isolados CECA R02, CECA R05, CECA R09, CECA R15 apresentaram as menores médias para a variável analisada, os demais isolados apresentaram-se como intermediários.

Figura 8. Visualização microscópica dos isolados rizobiais submetidos a coloração de Gram.



Fonte: (AUTOR, 2021)

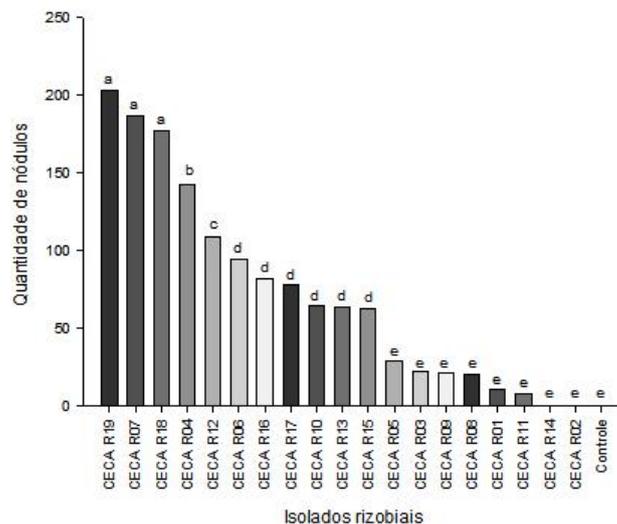
6.3 Infectividade dos isolados em etnovarietades de *P. lunatus*

Os 19 isolados rizobiais foram testados para a capacidade de infectar e promover o crescimento na etnovarietade RJM, caracterizada pela baixa capacidade de desenvolver naturalmente nódulos nas raízes. Os isolados CECA R02 e CECA R14 foram incapazes de infectar a etnovarietade RJM, não induziram a formação de nódulos das raízes, vale destacar que esses nódulos na caracterização morfofisiológica apresentaram capacidade de acidificar o meio.

Os isolados CECA R07, CECA R18 e CECA R19 infectaram a variedade RJM e apresentaram maior capacidade em induzir a formação de nódulos na variedade RJM (Figura 9). Os isolados CECA R07 e CECA R19 apresentaram pH neutro na caracterização morfo-

fisiológica, e o isolado CECA R18 possui a capacidade de acidificar o meio. Ressaltando que o isolado CECA R18 foi obtido da própria etnovarietade RJM. O isolado CECA R19 apresentou a maior média de número de nódulos, apresentando valores médios de 200 nódulos por planta. O isolado CECA R04 apresentou a quarta maior média de nodulação e na caracterização morfofisiológica também apresentou capacidade de neutralizar o meio. Oito isolados rizobiais (CECA R05, CECA R03, CECA R09, CECA R08, CECA R01, CECA R11, CECA R14 e CECA R02) apresentaram média de nódulo por planta que variaram entre 0 e 29 unidades sem diferenciar do tratamento controle. Os nódulos amostrados de forma aleatória de cada tratamento apresentaram a coloração róseo avermelhada na parte interna, indicando atividade biológica.

Figura 9. Número médio de nódulos por plantas observados na variedade RJM inoculadas separadamente com os 19 isolados rizobiais. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



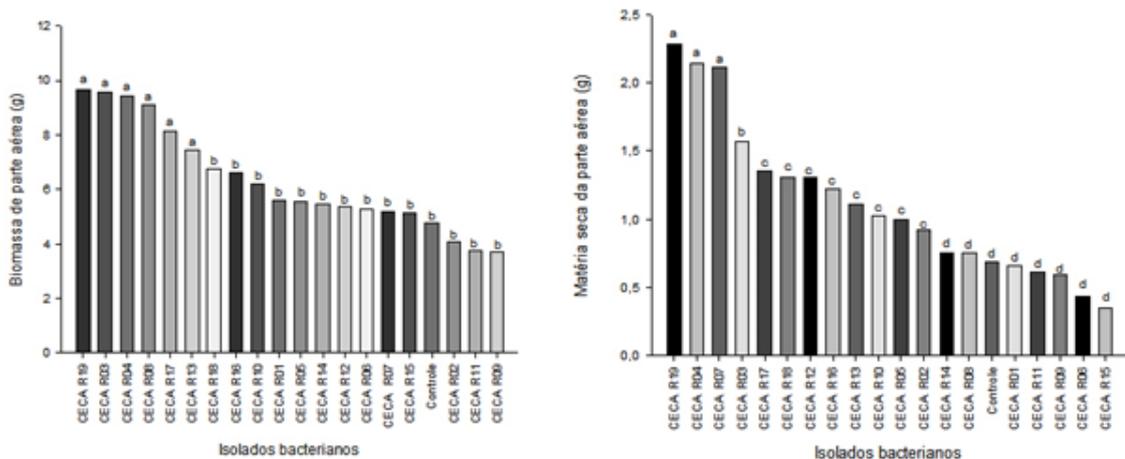
Fonte: (AUTOR, 2021)

Na avaliação de promoção de crescimento, 6 isolados rizobiais (CECA R03, CECA R04, CECA R08, CECA R13, CECA R17 e CECA R19) promoveram o crescimento

significativo da massa fresca da parte aérea em relação as plantas não inoculadas. Entre as bactérias com maior capacidade de promoção de crescimento estão bactérias com baixa nodulação (CECA R03 e CECA R08), nodulação mediana (CECA R13 e CECA R17) e alta nodulação (CECA R04 e CECA R19). O isolado CECA R19, isolado da etnovarietade SSSJ, promoveu a maior produção de biomassa apresentando valores de matéria fresca que variaram entre 9,28 e 10,25 gramas (Figura 10). O isolado CECA R19 promoveu um incremento de 103% da biomassa em relação ao tratamento controle.

Na avaliação do peso da matéria seca da parte aérea, 3 isolados rizobiais (CECA R04, CECA R07 e CECA R19) apresentam maior capacidade em promover a maior produção de massa seca da parte aérea. O isolado rizobial CECA R07 não foi destaque para produção de biomassa, mas foi para produção de matéria seca. As demais variedades foram distribuídas em outros dois grupos. Um grupo reuniu os isolados rizobiais que promoveram a terceira maior produção de massa seca e o outro grupo reuniu os isolados com médias de produção de massa seca similares ao controle.

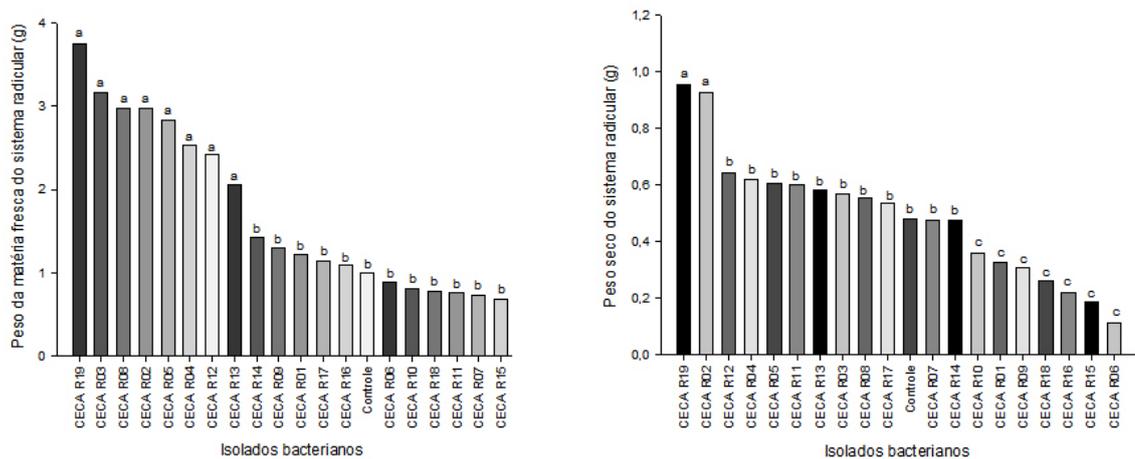
Figura 10. Média da biomassa e matéria seca da parte aérea de plantas da variedade RJM inoculadas separadamente com os 19 isolados rizobiais. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



Fonte: (AUTOR, 2021)

Na avaliação da produção de massa fresca e seca do sistema radicular, os isolados rizobiais foram diferenciados em dois grupos. Um grupo reuniu os 8 isolados rizobiais (CECA R02, CECA R03, CECA R04, CECA R06, CECA R08, CECA R13, CECA R12 e CECA R19) que induziram crescimento radicular. Um segundo grupo reuniu isolados que apresentaram desempenho similar ao controle. Na avaliação da massa seca das raízes somente dois isolados foram destaques, CECA R02 e CECA R19 (Figura 11).

Figura 11. Média do peso da matéria fresca e seca do sistema radicular de plantas da variedade RJM inoculadas separadamente com os 19 isolados rizobiais. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



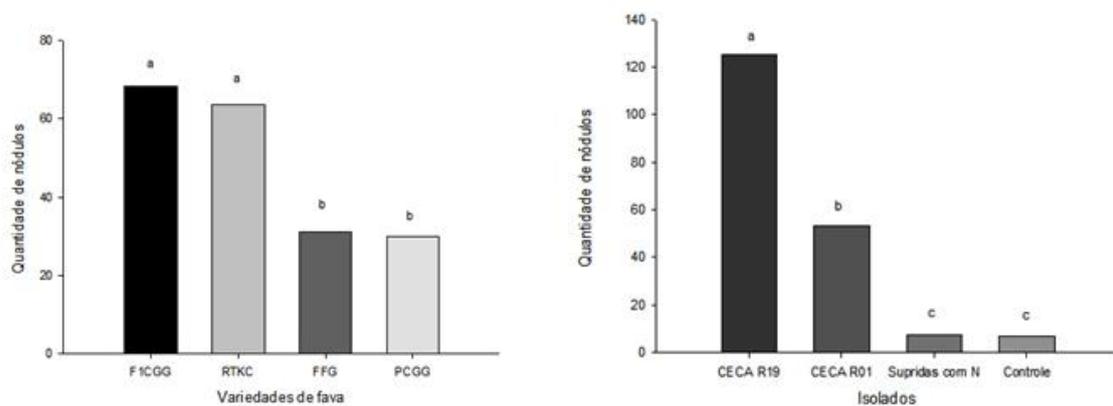
Fonte: (AUTOR, 2021)

6.4 Indução de resistência em *P. lunatus*

A capacidade dos dois isolados rizobiais (CECA R01 e CECA R19) em induzir resistência em *P. lunatus* foi observada principalmente nas variedades suscetíveis. Os isolados contrastam na capacidade de infectar e induzir a formação de nódulos. As etnovariedades caracterizadas por apresentar maior capacidade de nodulação (F1CGG e RTKC) apresentaram maior número de nódulos em relação as variedades com menor capacidade (PCGG e FFG). O isolado CECA R01 apresenta menor capacidade de nodulação em relação ao isolado CECA

R19. Com esperado, as condições controles apresentaram nodulação escassa. A suplementação de nitrogênio mineral não restringiu, embora escassa, a nodulação espontânea (Figura 12).

Figura 12. Média da quantidade de nódulos nas quatro variedades de fava e números de nódulos observados para as inoculações com as os isolados CECA R19 e CECA R01 e tratamento controles (sem inoculação com e sem nutrição mineral). Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



Fonte: (AUTOR, 2021)

No desdobramento dos fatores (variedades e tratamentos), todas as variedades tiveram baixa taxa de nodulação na condição controle, sem inoculação, e a suplementação com nitrogênio mineral não restringiu a nodulação espontânea. As variedades com menor capacidade de nodular (RTKC e PCGG) apresentaram um número de nódulos inferior nos tratamentos controles. O isolado bacteriano CECA R19 incrementou maior produção de nódulos nas etnovariedades que apresentam alta taxa de nodulação (FICGG e RTKC). A variedade PCGG apresentou menor número de nódulos para a inoculação com os dois isolados rizobiais. As variedades RTKC e FICGG tiveram maior produção de nódulos e diferenciaram entre si. As variedades FFG e PCGG apresentaram menor número de nódulos, e diferenciaram entre si. O isolado rizobial CECA R01 não diferenciou as variedades na capacidade de nodular mas diferenciaram na condição controle (Tabela 4).

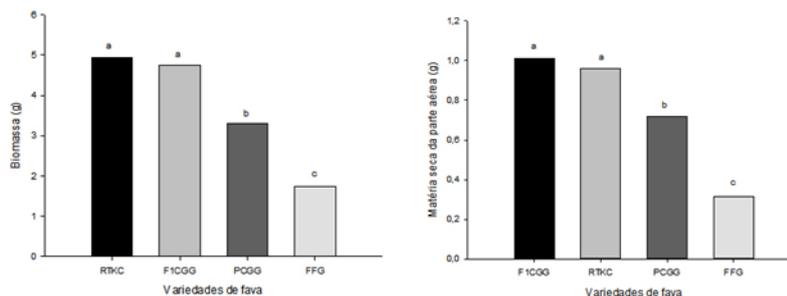
Tabela 4. Valores médios da quantidade de nódulos das etnovarietades de fava inoculadas com isolados rizobiais e adubadas com nitrogênio mineral.

Variedades	Controle	Supridas com N	CECA R19	CECA R01
FFG	3,50 aB	3,00 aB	100,25 cA	17,25 aB
PCGG	5,00 aB	3,50 aB	51,25 dA	60,00 aA
RTKC	8,25 aC	10,75 aC	148,75 bA	86,75 aB
F1CGG	10,50 aB	12,00 aB	201,75 aA	49,00 aB

Classificação com letras minúsculas para colunas e com letras maiúsculas para linhas.

A comparação da produção de matéria fresca e seca da parte aérea entre as variedades indica que as variedades com maior taxa de nodulação (F1CGG e RTKC) foram as que apresentaram maior incremento de produção (Figura 13), considerando todos os tratamentos. A susceptibilidade a antracnose não influenciou o acúmulo de matéria seca para variedade suscetível RTKC. As duas variedades com menor capacidade de nodular diferenciaram para a produção de matéria fresca e seca da parte aérea. A variedade suscetível (FFG) apresentou um menor acúmulo de matéria fresca e seca.

Figura 13. Média de biomassa e massa seca das diferentes etnovarietades de feijão-fava. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.

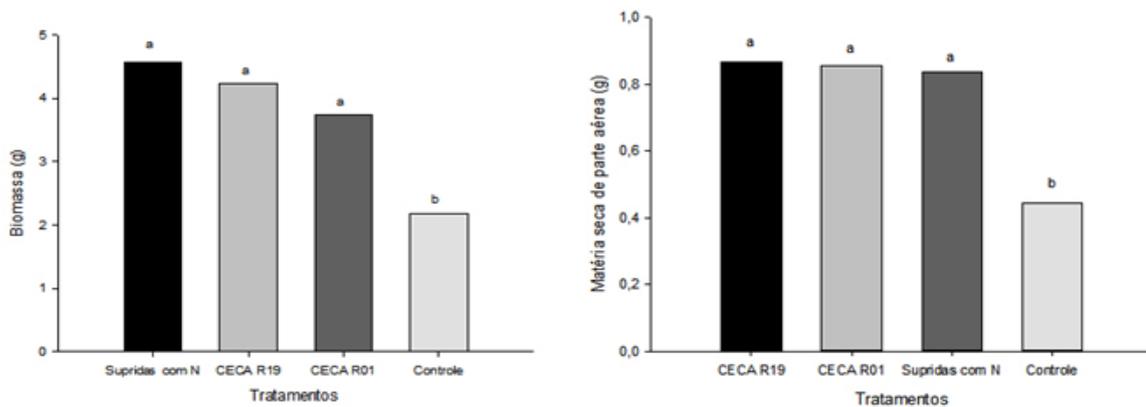


Fonte: (AUTOR, 2021)

As inoculações com as bactérias rizobiais e o fornecimento mineral de nitrogênio promoveram maior produção de biomassa e matéria seca nas variedades (Figura 14). Não foi

verificada interação significativa entre as etnovariedades de fava e tratamentos para as variáveis biomassa e matéria seca de parte aérea. Apesar de não haver diferenças entre as etnovariedades e tratamentos. As plantas do tratamento controle apresentaram menor média para as duas variáveis e as plantas da etnovariabilidade F1CGG inoculada com o isolado rizobial CECA R19 apresentou maior média para biomassa e matéria seca (Tabela 5 e 6).

Figura 14. Valores médios de biomassa e matéria seca das etnovariedades de fava inoculadas com isolados rizobiais e adubadas com nitrogênio mineral. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



Fonte: (AUTOR, 2021)

Tabela 5. Valores médios da matéria fresca das etnovariedades de fava inoculados com isolados rizobiais e adubadas com nitrogênio mineral.

Variedades	Controle	Supridas com N	CECA R19	CECA R01
FFG	0,66	2,23	1,91	2,18
PCGG	1,92	4,13	3,82	3,29
RTKC	3,59	6,78	4,32	5,06
F1CGG	2,52	5,15	6,90	4,44

Tabela 6. Valores médios da matéria seca das etnovarietades de fava inoculados com isolados rizobiais e adubadas com nitrogênio mineral.

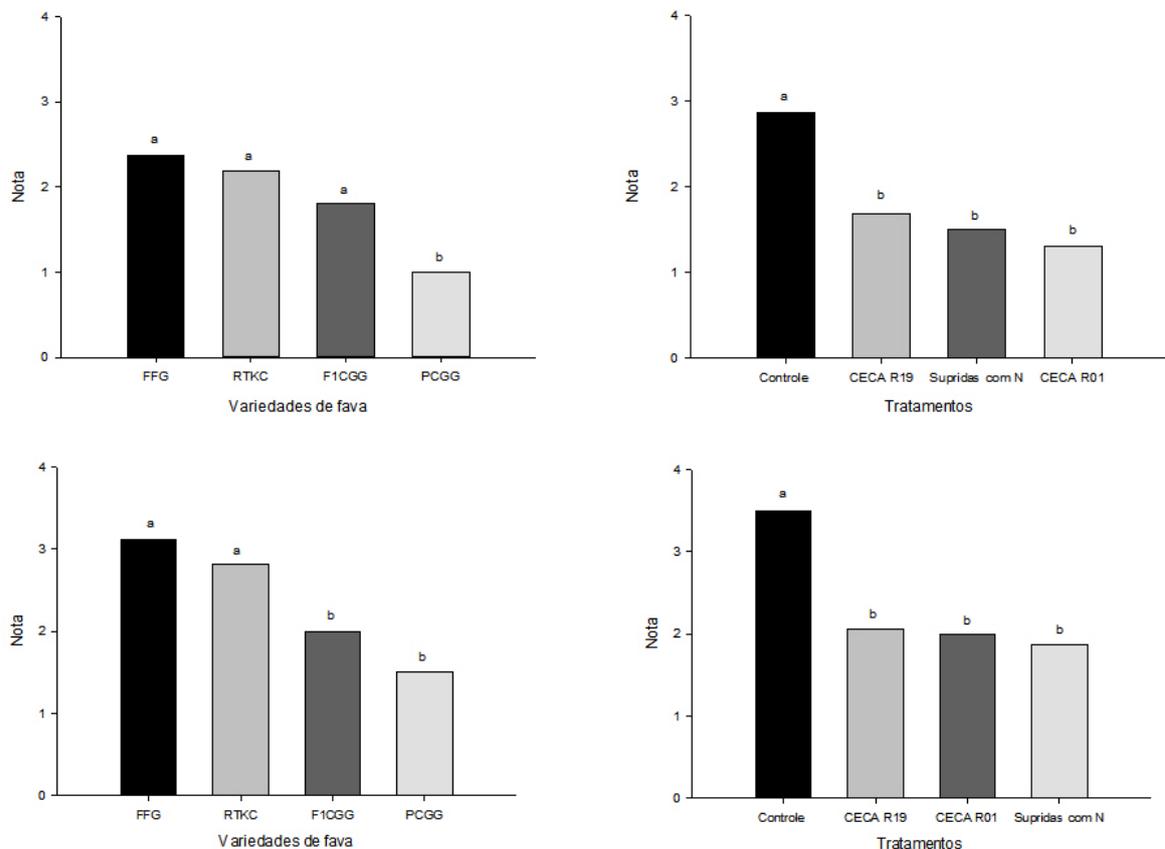
Variedades	Controle	Supridas com N	CECA R19	CECA R01
FFG	0,10	0,45	0,32	0,38
PCGG	0,59	0,77	0,77	0,72
RTKC	0,57	1,03	1,11	1,11
FICGG	0,50	1,08	1,25	1,19

As plantas desafiadas com o patógeno *C. truncatum* desenvolveram os sintomas característicos da antracnose. Os primeiros sintomas de manchas de coloração marrom escura nas folhas, nervuras centrais e ramos surgiram entre o segundo e o terceiro dia após o desafio com o patógeno. Também foram observados os sintomas de abscisão foliar. A evolução dos sintomas entre o 3º e o 5º dia aconteceu principalmente para as variedades suscetíveis e na condição de controle. A evolução dos sintomas foi ausente nas plantas inoculadas com as bactérias rizobiais (Figura 15). As diferenças entre os tratamentos no terceiro dia de avaliação de resposta ao patógeno foi significativa ao nível de 1%. As diferenças entre os tratamentos no quinto dia de avaliação de resposta ao patógeno foi significativa ao nível de 5%.

No terceiro dia após a inoculação, as variedades suscetíveis (FFG e RTKC) apresentaram maiores notas de severidade em relação aos demais tratamentos. A variedade resistente (FICGG) não diferiu estatisticamente das duas variedades suscetíveis. No quinto dia após a inoculação, as variedades suscetíveis apresentaram maiores notas de severidade e foram classificadas como altamente suscetível (FFG) e moderadamente suscetível (RTKC), as variedades consideradas resistentes apresentaram menores notas e foram agrupadas como moderadamente resistentes. Nos tratamentos em ambos os períodos de avaliação da severidade, o tratamento controle apresentou os maiores valores, sendo classificado como moderadamente suscetível aos 3 dias após a inoculação com ICT12 de *C. truncatum* e altamente suscetível aos 5 dias após a inoculação do patógeno. As menores médias foram registrados para os tratamentos com a inoculação dos isolados rizobiais e o fornecimento de

nitrogênio mineral, apresentando a condição de moderadamente resistentes aos 5 dias após a inoculação.

Figura 15. Severidade da antracnose causa pela inoculação com o isolado ICT12 de *Colletotrichum truncatum* nas etnovariedades (A e C) e nas plantas nas condições controle, nutridas com nitrogênio mineral e inoculadas com os isolados de bactérias rizobiais (B e D) aos 3 (A e B) e 5 (C e D) dias após a inoculação. Médias seguidas de letras distintas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (valor de $p < 0,05$). Dados originais.



Fonte: (AUTOR, 2021)

Nos desdobramentos de variedades e tratamentos na avaliação da severidade aos três dias, as etnovariedades resistentes (PCGG e F1CGG) apresentaram menor notas de severidade (1 e 2,75) e as etnovariedades suscetíveis (FFG e RTKC) as maiores notas (3,25 e 4,5) na condição controle. Nas condições de nutrição mineral e inoculadas com o isolado rizobial

CECA R01, a variedade FFG, suscetível e com menor capacidade de nodular, teve menores notas de severidade. Na interação da variedade FFG com o isolado CECA R19 a nota de severidade foi inferior ao controle, mas superior aos tratamentos mais efetivos. A etnovarietade RTKC, suscetível e com maior capacidade de nodulação, não teve redução significativa das notas em relação aos tratamentos de fornecimento mineral de nitrogênio ou inoculação das bactérias. Da mesma forma aconteceu para a variedade PCGG, resistente e menor capacidade de nodulação.

A variedade F1CGG apresentou redução da severidade com fornecimento mineral de nitrogênio em relação ao controle. No entanto, nas inoculações com os isolados rizobiais não houve redução da nota de severidade em relação ao controle. No tratamento controle a variedade PCGG apresentou menor nota de severidade. Na suplementação como nitrogênio a variedade F1CGG apresentou menor nota de severidade. Na inoculação com o isolado rizobial CECA R19, a variedade PCGG apresentou menor nota de severidade. Na inoculação com CECA R01, as notas não diferenciaram entre variedades.

Tabela 7. Valores médios de severidade das etnovarietades de fava ao isolado ICT12 de *Colletotrichum truncatum* aos 3 dias após a inoculação.

Variedades	Controle	Supridas com N	CECA R19	CECA R01
FFG	4,50 aA	1,50 aC	2,75 aB	0,75 aC
PCGG	1,00 bA	2,00 aA	0,25 bA	0,75 aA
RTKC	3,25 aA	2,25 aA	1,50 aA	1,75 aA
F1CGG	2,75 aA	0,25 bB	2,25 aA	2,00 aA

Classificação com letras minúsculas para colunas e com letras maiúsculas para linhas.

Na avaliação da severidade aos cinco dias após o desafio com o patógeno, as etnovarietades resistentes (PCGG e F1CGG) apresentaram menor notas de severidade (2,25) e as etnovarietades suscetíveis (FFG e RTKC) as maiores notas (5 e 4,5) na condição controle. As variedades suscetíveis (FFG e RTKC) tiveram redução significativa das notas de severidades com o fornecimento mineral de nitrogênio e com a inoculação dos dois isolados

de bactérias rizobiais. As variedades resistentes (PCGG e FICGG) não apresentam redução das notas de severidade em relação ao controle.

Na avaliação dos tratamentos, as variedades diferenciaram em resistente e suscetíveis no controle. Nas condições com o fornecimento mineral de nitrogênio e com a inoculação dos dois isolados de bactérias rizobiais, as variedades resistentes e suscetíveis não diferenciaram. A exceção foi a variedades PCGG, resistente e com menor capacidade nodular. A variedade apresentou menor nota de severidade entre as variedades inoculadas com o isolado CECA R19.

Tabela 8. Valores médios de severidade das etnov variedades de fava ao isolado ICT12 de *Colletotrichum truncatum* aos 5 dias após a inoculação.

Variedades	Controle	Supridas com N	CECA R19	CECA R01
FFG	5,00 aA	2,50 aB	3,25 aB	1,75 aB
PCGG	2,25 bA	1,75 aA	0,50 bA	1,50 aA
RTKC	4,50 aA	2,25 aB	2,25 aB	2,25 aB
FICGG	2,25 bA	1,00 aA	2,25 aA	2,50 aA

Classificação com letras minúsculas para colunas e com letras maiúsculas para linhas.

7 DISCUSSÃO

As interações mediadas pelo hospedeiro entre espécies simbióticas fixadoras de nitrogênio e fitopatógenos podem ser associadas a duas interpretações contrastantes. A primeira aborda a capacidade do simbionte em induzir a resistência contra patógenos (PIETERSE et al., 2009; MARTINUZ et al., 2012). A segunda aborda a capacidade do simbionte em induzir a suscetibilidade ao patógeno (KATAYAMA et al., 2010; PINEDA et al., 2012; DEAN et al., 2014). A interação entre *Rhizobium* e *C. lindemuthianum* em *P. vulgaris* aponta para a indução de tolerância a doença, bem como para insetos pragas foliares (NALUYANGE et al., 2014, 2016). Assim como a interação entre bactérias rizobiais e *C. truncatum* em *P. lunatus* aponta para a indução de resistência, indicando que a maior resistência da planta em nodular e a maior capacidade de infecção do isolado rizobial modulam a resposta de planta suscetíveis e resistentes ao *C. truncatum*.

A capacidade das etnovariedades em nodular foi avaliada em condição de infecção espontânea. As etnovariedades diferenciam na capacidade em nodular. Os isolados rizobiais coletado das etnovariedades de *P. lunatus* apresentaram pouca variação morfológica e todos os isolados são gram-negativos. O teste de Gram é um dos passos iniciais para autenticação do rizóbio, todas as espécies de rizóbio são Gram-negativas (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994). As etnovariedades de fava confirmaram observações anteriores relacionadas com a capacidade de nodulação (SOARES, 2019). As variedades BBN, RTKC, RBN confirmaram a maior capacidade para nodulação espontânea. As etnovariedades PCGG, FFG, RJM, FAM, CTL, BCGG, OPBJJ, RJV, PCGG e FIJ foram as etnovariedades com menor capacidade para nodulação natural.

Os acessos de *P. lunatus* cultivados do Brasil parece apresentar maior potencial para a nodulação por rizóbios (ARAÚJO et al. 2017). A verificação da eficiência das etnovariedades de feijão-fava à infecção espontânea por bactérias rizobiais têm grande importância para indicação de plantio de uma variedade, pois a maioria das áreas de cultivo são oriundas de agricultura familiar, sem adoção de tecnologia e manejo que visem o aumento da produtividade (SANTOS et al., 2002). As diferenças na nodulação observada para as 19 etnovariedades podem representar diferenças genótípicas das etnovariedades e das bactérias

residentes no solo, assim como suas interações e condições ambientais (COSTA NETO, 2016).

Os nódulos das etnovariedades RJV, RBN, F1CGG e RTKC apresentaram tamanho maior em relação aos das demais variedades e se concentraram próximo a raiz principal. O tamanho e a distribuição dos nódulos são parâmetros complementares e importantes na avaliação da nodulação e da fixação de nitrogênio (IKEDA, 1999). Existe uma forte correlação entre o tamanho dos nódulos e a eficiência simbiótica (HUNGRIA; BOHER, 2000).

Geralmente os nódulos mais eficazes são grandes e agrupados na zona principal da raiz, enquanto os nódulos ineficazes são pequenos, numerosos e geralmente distribuídos na raiz secundária (HUNGRIA; BOHER, 2000). Genótipo de *Phaseolus lunatus* (PI 440808, EUA) que se destacam por apresentar nódulos maiores na região principal da raiz tem maior produção de biomassa das plantas. No entanto, genótipos com maior distribuição de nódulos nas raízes secundárias e tamanho inferior aos nódulos do genótipo PI 440808 (EUA), não podem ser considerados ineficazes, tendo em vista que apresentavam tamanho e coloração adequados (ARAÚJO et al., 2017).

Os isolados rizobiais variaram na capacidade de nodulação na etnovariedade com baixa capacidade de nodulação (RJM). Alguns isolados se destacaram e foram eficientes na nodulação. Nem todo isolado rizobial é capaz de infectar e gerar nódulos na planta hospedeira uma vez que a capacidade de nodulação pode variar. Isolados de microssimbiontes associados à nodulação da soja de solos moçambicanos mostrou que 61% induziram nódulos radiculares eficazes em plantas de soja da variedade TGx1908-8F (GYOGLUU et al., 2018). A biodiversidade e biogeografia de rizóbios associados ao feijão-comum que foram inoculados em raízes de feijoeiro mostrou que a maioria conseguiu induzir a formação de nódulos com sucesso (WANG et al., 2016). Alguns isolados produziram maior massa fresca, mas não massa seca, provavelmente possam atuar mais como promotores de crescimento.

O isolamento de bactérias rizobiais em feijão caupi, demonstrou que a maioria dos isolados de crescimento rápido acidificaram o meio, enquanto os de crescimento lento alcalinizaram (MARTINS et al., 1997). A habilidade dos rizóbios de alcalinizar o meio representa uma vantagem seletiva (MARTINS, 1996). A temperatura e pH do solo são fatores

determinantes para o sucesso do isolado rizobial em promover uma nodulação eficiente nas leguminosas associadas (NEVES et al., 1998).

Os isolados que promoveram maior taxa de nodulação, na etnovarietade RJM apresentaram capacidade de manter o pH neutro na caracterização morfofisiológica. A exceção foi o isolado CECA R18. O isolado acidificou o meio e apresentou alto índice de nodulação, mas foi isolado de plantas da própria etnovarietade RJM. Os isolados CECA R02 e CECA R14 foram incapazes de infectar a etnovarietade RJM, e não induziram a formação de nódulos das raízes. Vale destacar que esses isolados na caracterização morfofisiológica apresentaram capacidade de acidificar o meio. Os maiores acúmulos de biomassa na parte aérea são encontrados em plantas que desenvolvem nódulos (ARAÚJO et al., 2017). A produtividade da planta, medida pelo peso seco da parte aérea apresentou maior incremento nas etnovarietades que apresentaram alta taxa de nodulação (ARAÚJO et al., 2017). Isolados altamente eficazes registraram maior número de nódulos e biomassa vegetal (GYOGLUU et al., 2018).

A capacidade de rizóbio em acidificar o meio não deve ser vista como fator negativo. A acidificação pode ser uma vantagem competitiva da capacidade de isolados rizobiais sobreviverem num determinado pH. Rizóbios isolados de solos ácidos são capazes de excretar em meio de cultura, substâncias que alcalinizam o meio, enquanto rizóbios isolados de solos alcalinos, acidificam o meio, o que parece ser um mecanismo de adaptação a condições adversas (NORRIS, 1965). O rizóbio produtor de base representa uma forma menos evoluída de que aquele produtor de ácido (NORRIS, 1965). O rizóbio produtor de base de crescimento lento pode ter evoluído com leguminosas de origem tropical. Os solos tropicais são tipicamente ácidos e é possível que a habilidade de alcalinizar o meio represente uma vantagem seletiva.

Os isolados rizobiais com maiores taxas de nodulação apresentaram menores médias para as colônias isoladas na caracterização morfofisiológica (CECA R07 e CECA R19). O isolado CECA R18 foi exceção, apresentou alto valor para tamanho das colônias isoladas e alta taxa de nodulação. Existe uma correlação entre o tamanho da colônia do rizóbio e suas características na habilidade para fixar nitrogênio simbioticamente (ALLEN et al., 1950).

Isolados que formam colônias grandes são simbioticamente ineficientes enquanto os que originaram colônia pequenas são considerados eficientes (HERRIDGE et al., 1975).

Os dois isolados contrastantes selecionados diferenciaram no tipo de crescimento, intermediário e rápido. Segundo a teoria evolucionária das leguminosas, o rizóbio de crescimento lento representa uma forma ancestral, os rizóbios de crescimento rápido associados mais frequentemente a leguminosas temperadas, são consideradas mais avançadas taxonomicamente e apresentam maior especificidade de hospedeiros (MARTINS et al., 1997).

A inoculação com os dois isolados rizobiais e o posterior desafio com o patógeno, *C. truncatum* indicou o efeito positivo da simbiose na indução de resistência. As variedades suscetíveis noduladas tiveram a resistência induzida apresentando menores nota de severidade em relação ao controle. Principalmente após o maior tempo de estabelecimento do patógeno, aos cinco dias. A resposta de resistência das variedades aconteceu como esperado quando inoculadas apenas com o patógeno, *C. truncatum*. Os sintomas apareceram entre o segundo e terceiro dia após a inoculação. O tempo de aparecimento das lesões pode variar de 72 a 144 horas (CHONGO et al., 2001), esse curto espaço de tempo está relacionado com o comportamento hemibiotrófico do gênero *Colletotrichum*, resistência do hospedeiro e virulência do isolado (MUNCH et al., 2008). O processo de infecção de isolados hemibiotróficos de *C. truncatum* inicia com a penetração da superfície do hospedeiro. A fase biotrófica assintomática é caracterizada pela formação de grandes hifas restritas às células epidérmicas inicialmente infectadas. A biotrofia dura 48 horas de interação e em seguida tem-se a fase necrotrófica, quando as hifas secundárias se estreitam e invadem os tecidos foliares causando lesões.

A resposta de resistência apresentada pela planta nodulada foi similar a resposta das plantas supridas adequadamente com nitrogênio. O aumento da resistência pode ser confundido coma melhor nutrição da planta provida pelo suprimento mineral. No entanto, somente as plantas suscetíveis tiveram melhora no desempenho. As plantas resistentes inoculadas ou supridas adequadamente com nitrogênio mantiveram desempenho similar ao controle. Havendo uma interação entre isolado e genótipo (PCGG e CECA R19). A contribuição da simbiose para resistência é conhecida. O *R. meliloti* inibiram o crescimento in vitro de *M. phaseolina*, *R. solani* e *F. solani*, enquanto *B. japonicum* inibiu *M. phaseolina* e *R.*

solani produzindo zonas de inibição (EHTESHAMUL-HAQUE et al., 1993). Em campo *R. meliloti*, *R. leguminosarum* e *B. japonicum* usados como cobertura de sementes ou como rega do solo reduziram a infecção de *M. phaseolina*, *R. solani* e *Fusarium* spp., em plantas leguminosas (soja, feijão-mungo) e não leguminosas (girassol e quiabo).

O estado nutricional de uma planta tem um grande impacto na suscetibilidade a doenças, e isso tem sido explorado para a redução da severidade da doença (HUBER et al. (1974). Em *Phaseolus vulgaris* a inoculação de bactérias rizobiais promove a adequação da planta hospedeira a *C. lindemuthianum*, aumentando a tolerância da planta hospedeira ao patógeno (KARONEY et al. 2020). A infecção por *Rhizobium* em feijão-comum aumenta a produção de compostos nutritivos à base de nitrogênio, enquanto limita a produção de compostos orgânicos à base de carbono associados à resistência da planta (KARONEY et al. 2020).

A modulação do nitrogênio na resistência de *Medicago truncatula* a *Aphanomyces euteiches* verificou que a deficiência de nitrogênio leva ao aumento ou redução da suscetibilidade dependendo do genótipo da planta (THALINEAU et al., 2018). A modulação de resistência da planta pelo nitrogênio não está ligada à resposta da planta à privação do nutriente, e destacam a importância da glutamina (Gln) no aumento da suscetibilidade das plantas. Não existe uma regra sobre o resultado da fertilização com nitrogênio e severidade da doença. Outros fatores podem estar envolvidos na modulação pelo N da resistência das plantas a patógenos, como a capacidade da planta em mobilizar o N e sintetizar compostos de defesa (BALLINI et al., 2013).

O nitrogênio além de afetar a resistência da planta quantitativamente, pode afetar também qualitativamente. Em tabaco a forma de N (nitrato ou amônio) afeta a resposta de defesa e resistência à infecção bacteriana (GRUPTA et al., 2013). A morte celular é mais rápida em plantas nutridas com nitrato em comparação as plantas nutridas com amônio. O fornecimento de nitrato proporcionou a biossíntese de poliamina, enquanto o amônio teve seu fluxo desviado para produção de ácido 4-aminobutírico (GABA), um metabólito derivado do glutamato. O acúmulo de GABA já foi relatado como resposta das plantas a estresses ambientais (KINNERSLEY et al. 2010).

A resistência sistêmica induzida em plantas de amendoim inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. ao patógeno *Sclerotium rolfsii* acontece com cepas que promovem a nodulação. Cepas mutantes incapazes de nodular devido à debilidade em produzir os fatores de nodulação são menos eficientes na indução de resistência ao referido patógeno (FIGUEIREDO et al., 2017).

A contribuição nutricional pode ser um fator importante, mas observa-se modulações na resposta das plantas com menor capacidade de formar nódulos contra os isolados rizobiais com maior capacidade infectiva. Na variedade suscetível observa-se um fator associado à resposta ao patógeno dissociado provavelmente da nutrição. A inoculação com isolado rizobial apesar de induzir a redução da severidade, esta foi inferior à observada para planta nutrida somente com nitrogênio e inoculada com o isolado menos infectivo (CECAR01). A capacidade do isolado CECAR19 em infectar mais a variedade suscetível manteve a fisiologia da planta mais suscetível a colonização inicial do patógeno. O efeito parece ser restrito a colonização inicial pois aos 5 dias a planta apresenta uma nota de severidade similar aos demais tratamentos.

As variedades resistentes não apresentam mudanças nas notas da severidade nos diferentes tratamentos. No entanto, na comparação dentro do tratamento, a variedade resistente com menor capacidade de nodulação apresentou menor nota de severidade quando inoculadas com o isolado rizobial mais infectivo. A inoculação da planta que desafia mais o sistema de defesa da planta, alterou a fisiologia fazendo com que a colonização pelo patógeno fosse reduzida. A restrição à nodulação afeta a modulação da resposta de defesa de acordo com características de resistência da planta e a natureza infectiva do isolado rizobial. Plantas suscetíveis infectadas por isolados com alta capacidade de infecção podem favorecer o estabelecimento do patógeno e plantas resistentes ficam mais resistentes.

8 CONCLUSÃO

A simbiose com bactérias rizobiais induz em etnovarietades suscetíveis de *P. lunatus* a resistência á antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum truncatum*.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFRA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Ed. UFV: Viçosa, 2007, p. 23-50.
- ALLEN, E. K.; ALLEN, O. N. Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. **Botanical Review**, v. 14, n. 1, p. 273-330, 1950.
- ARAÚJO, A. S. F.; LOPES, A. C. A.; TERAN, J. C. B. M.; PALKOVIC, A.; GEPTS, P. Nodulation ability in different genotypes of *Phaseolus lunatus* by rhizobia from California agricultural soils. **Symbiosis**, v. 73, p. 7-14, 2017.
- ARFAOUI, A.; SIFI, B.; BOUDADOUS, I.; EL HADRAMI, I.; CHÉRIF, M. Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of *fusarium* wilt of chickpea. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 67-75, 2006.
- ASSISTAT Assistência Estatística. Versão 7.7, Brasil: UFCG, 2017. Programa estatístico.
- AZEVEDO, J. N.; FRANCO, L. J. D.; ARAÚJO, R. O. C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina: Embrapa, 5 eds. abr. 2003, 76 p.
- BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant Cell Environ**, v. 32p, n. 1, 666-681, 2009.
- BAIS, H. P.; PARK, S. W.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends Plant**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2004.
- BALLINI, E., NGUYEN, T. T.; MOREL, J. B. Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. **Rice**, v. 6, n. 32, p. 1-13, 2013.
- BELMINO, C. S. **Resistência do feijão-caupi a *Colletotrichum truncatum***. Doutorado (Tese), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2004, 64p.
- BISELING, T.; DANGL, J. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Next-generation communication. **Science**, v. 324, n. 1, p. 691-699, 2009.
- BYRNE, J. M.; HAUSBECK, M. K.; MELOCHE, C.; JAROSZ, A. M. Influence of dew period and temperature on foliar infection of green house grown tomato by *Colletotrichum coccodes*. **Plant Disease**, v. 82, p. 639-641, 1998.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação: patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e métodos**. Viçosa, 2018, p. 423-452.

CARRILLO, G. C.; VAZQUEZ, M. R. G. Comparative study of siderophore-like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of plant nutrition**, v. 15, n. 5, p. 579-590, 1992.

CARVALHO, E. M. S. **Antracnose em feijão-fava: caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum***. Doutorado (Tese), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal – SP, 2009, 53p.

CAVALCANTE, G. R. S. **Reação de subamostras de feijão-fava à antracnose e seu controle com extrato de nim**. Mestrado (Dissertação), Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, 2011, 62p.

CAVALCANTE, G. R. S.; VIEIRA, W. A. S.; MICHEREFF, S. J.; BARGUIL, B. M.; DOYLE, V. P.; CAMARA, M. P. S. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum sichuanensis* on *Phaseolus lunatus* in Brazil. **Plant Sciences**, v. 102, v. 3, p. 680-680, 2018.

CHONGO, G.; GOSSEN, B. D.; BERNIER, C. C. Infection by *Colletotrichum truncatum* in resistant and susceptible lentil genotypes. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 24, n. 1, p. 81-85, 2001.

COSTA NETO, V. P. **Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em feijão-fava inoculado com rizóbios isolados de solos da microrregião do Médio Parnaíba Piauiense**. Mestrado (Dissertação). Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, 2016, 59p.

COSTA, I. F. D.; BALARDINI, R. S.; MEDEIROS, L. A. M.; LENZ, G.; GOULART, C. A.; ZEMOLIN, C. R.; SILVA, T. M. B. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 47-50, 2009.

CRONQUIST, A. **Devolution and classification of flowering plants**. New York, New York Botanical Garden, p. 555, 1998.

D'HAENZE, W.; HOLSTERS, M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, v. 12, n. 6, p. 79-105, 2002.

DEAN, J.; MESCHER, M.; DE MORAES, C. Plant dependence on rhizobia for nitrogen influences induced plant defenses and herbivore performance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 1, p. 1466–1480, 2014.

DELGADO-SALINAS, A.; BIBLER, R.; LAVIN, M. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). **Systematic Botany**, v. 31, n. 4, p. 779-791, 2006.

- DELGADO-SALINAS, A.; BIBLER, R.; LAVIN, R.; Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. **Systemic Botany**, v. 31, n. 1, p. 779-791, 2006.
- DIONISIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D. Isolamento de rizóbios de raízes de leguminosas. In: DIONISIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D.; PAULA, A. M. de; MACEDA, A.; MATANNA, A. L. **Guia prático de biologia do solo**. Petrolina, 2016, p. 60-66.
- EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFAR, A. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. **Journal of phytopathology**, v. 138, n. 2, p. 157-163, 1993.
- ESSALMANI, H.; LAHLOU, H. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, n. 12, p. 1163-1173, 2003.
- FERNANDES, M. C. A.; SANTOS, A. S.; RIBEIRO L. D. Adaptação patogênica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de frutos de jiloeiro, pimentão e berinjela. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 325-330, 2002.
- FIGUEREDO, M. S.; TONELLI, M. L.; IBÁÑEZ, F.; MORLA, F.; CERIONI, G.; TORDABLE, M. C.; FABRA, A. Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. **Microbiological Research**, v. 197, n. 1, p. 65-73, 2017.
- GOES, L. B. O. **Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de tomateiro**. 55 f. 2013. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió.
- GRUPTA, K. J.; BROTMAN, Y.; SEGU, S.; ZEIER, J.; PERSIJN, S. T.; CRISTESCU, S. M.; HARREN, F. J.; BAUWE, H.; FERNIE, A. R.; KAISER, W. M.; MUR, L. A. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringa* pv. *phaseolicola* in tobacco. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.2, p. 553-568, 2013.
- GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSLER, I. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 86-95, 2009.
- GUIMARÃES, W. N.; MARTINS, L. S. S.; SILVA, E. F.; FERRAZ, G. M. G.; OLIVEIRA, F. J. Caracterização morfológica e molecular de acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 37-45, 2007.

- GYOGLUU, C.; JAISWAL, S. K.; KYEI-BOAHEN, S.; DAKORA, F. D. Identification and distribution of microsymbionts associated with soybean nodulation in Mozambican soils. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 506-515, 2018.
- HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 5. ed, 2014, 76p.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soils**, v. 311, n. 1., p. 1-18, 2008.
- HERRIDGE, D. F.; ROUGHLEY, R. J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 38, n. 1, p. 19-27, 1975.
- HUBER, D. M.; WATSON, R. D. Nitrogen form and plant disease. **Annual Reviews**, v. 35, n. 1, p. 139-165, 1974.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1. ed, 1994. 542p .
- HUNGRIA, M.; BOHER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology, and Fertility of Soils**, v. 31, p. 45-52, 2000.
- HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma de micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras de crescimento vegetal**. 1. ed. Embrapa: Brasília, DF, 2011.
- HYDE, K. D.; CAI, L.; MACKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 1-17, 2009.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Brasil, Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=o-que-e>>Acessado em 22/06/2019.
- IKEDA, J. Differences in numbers of nodules and lateral roots between soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 45, n. 3, p. 591-598, 1999.
- KARONEY, E. M.; OCHIENO, D. M. W.; BARAZA, D. L.; MUGE, E. K.; NYABOGA, E. N.; NALUYANGE, V. *Rhizobium* improves nutritive suitability and tolerance of *Phaseolus*

vulgaris to *Colletotrichum lindemuthianum* by boosting organic nitrogen content. **Applied Soil Ecology**, v. 149, n. 1, p. 1-7, 2020.

KATAYAMA, N.; NISHIDA T.; ZHANG, Z.Q.; OHGUSHIO, T. Belowground microbial symbiont enhances plant susceptibility to a spider mite through change in soybean leaf quality. **Population Ecology**, v. 52, n. 4, p. 499-506, 2010.

KINNERSLEY, A., M.; TURANO, F., F. Gamma Aminobutyric Acid (GABA) and Plant Responses to Stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 6, p. 479-509, 2010.

LAKSHMESHA, K. K.; LAKSHMIDEVI, D. N.; MALLIKARJUNA, A. S. Changes in pectinase and cellulase activity of *Colletotrichum capsici* mutants and their effect on anthracnose disease on Capsicum fruit. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 38, p. 267-279, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasil, Brasília. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em: 24/06/2019.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 1005-1010, 1997.

MARTINS, L. M.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. 1. ed. Embrapa: Rio de Janeiro, RJ, 1997.

MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio de caupi (*Vigna unguiculata* (L)Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do Brasil**. Mestrado (Dissertação), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – RJ, 1996, 213 p.

MARTINUZ, A., SCHOUTEN, A., SIKORA, R.A. Systemically induced resistance and microbial competitive exclusion: implications on biological control. **Phytopathology**, v. 102, n. 3, p. 260–266, 2012.

MCGOVERN, R. J. First report of fruit rot of *Capsicum chinense* caused by two *Colletotrichum* species. **Plant Disease**, v. 79, n. 2, p. 212, 1995.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Ciência Agrônômica**, v. 3, n. 1, p. 170-179, 2006.

MUNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D. S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.

NALUYANGE, V.; OCHIENO, D.M.; MAINGI, J.M.; OMBORI, O.; MUKAMINEGA, D.; AMODING, A.; MUOMA, J.V. Compatibility of *Rhizobium* inoculant and water hyacinth compost formulations in rosecoco bean and consequences on *Aphis fabae* and *Colletotrichum lindemuthianum* infestations. **Applied Soil Ecology**, v. 76, n. 1, p. 68–77, 2014.

NALUYANGE, V.; OCHIENO, D.M.; WANDAHWA, P.; ODENDO, M.; MAINGI, J.M.; AMODING, A.; MUOMA, J.V. Belowground influence of *Rhizobium* inoculant and water hyacinth composts on yellow bean infested by *Aphis fabae* and *Colletotrichum lindemuthianum* under field conditions. **Journal of Plant Studies**, v. 5, n. 2, p. 32–41, 2016.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais**. Jaguariúna: Embrapa, 1. ed, 1998, 486 p.

NORRIS, D. O. Acid production by *Rhizobium* a unifying concept. **Plant and Soil**, v. 22, n. 2, p. 143-166, 1965.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL-HERNÁNDEZ, M. A.; LLORET, L.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; MARTÍNEZ, J.; BAROIS, I.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Change in Land Use Alters the Diversity and Composition of *Bradyrhizobium* Communities and Led to the Introduction of *Rhizobium etli* into the Tropical Rain Forest of Los Tuxtlas (Mexico). **Microbial Ecology**, v. 63, n. 4, p. 822-834, 2012.

ÖZKOÇ, I.; DELIVELI, M. H. In Vitro Inhibition of the Mycelial Growth of Some Root Rot Fungi by *Rhizobium leguminosarum* Biovar phaseoli Isolates. **Academic Journals**, v. 25, n. 1, p. 435-445, 2001.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e métodos**. Viçosa, 2018, p. 423-452.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. In: SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, n. 17, v. 182, p. 63-71, 1995.

PIETERSE, C.M.; LEON-REYES, A.; VAN DER ETN, S.; VAN WEES, S.C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v 5, n. 5, p. 308-316, 2009.

PINEDA, A.; ZHENG, S.J.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Rhizobacteria modify plant-aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. **Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 83-90, 2012.

QUANT Image Processing Software. Versão 1.0.2. Nova Zelândia: Vale, 2003. Programa de avaliação de severidade de doenças.

REY, T.; NARS, M.; BONHOMME, A.; BOTTIN, S.; HUGUET, S.; BALZERGUE, S.; JACQUET, C. NFP, a LysM protein controlling Nod factor perception, also intervenes in *Medicago truncatula* resistance to pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 10, p. 566-574, 2013.

RODRIGUES, L. S.; ANTUNES, I. F.; TEIXEIRA, M. G.; SILVA, J. B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1275-1284, 2002.

SANTOS, D.; CORLETT, F. M. F.; MENDES, J. E. M. F.; WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A. **Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no estado da Paraíba**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 37, n. 10, p. 1407-1412, 2002.

SERRA, I. M. R. S.; COELHO, R. S. B.; FERRAZ, G. M. G.; MONTARROYOS, A. V. V.; SILVA, D. S. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécies. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 42-51, 2011.

SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E.; MORAL, A. Z. D.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELGADO-SALINAS, A.; SÁNCHEZ, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Symbiont shift towards *Rhizobium* nodulation in a group of phylogenetically related *Phaseolus* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 79, n. 1, p. 1-11, 2014.

SERVÍN-GARCIDUEÑAS, L. E.; ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; DELGADO, A. S.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; SÁNCHEZ, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genome sequence of *Rhizobium* sp. strain CCGE 510, a symbiont isolated from nodules of the endangered wild bean *Phaseolus albescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 1, p. 6310-6311, 2012.

SIGMAPLOT Exact Graphs and Data Analysis Software. Versão 12.0, Estados Unidos da América: Systat, 2011. Programa estatístico.

SILVA, A. J.; CANTERI, M. G.; SILVA, A. L. Haste verde e retenção foliar na cultura da soja. **Summa Fitopatológica**, v. 39, n. 3, p. 151-156, 2013.

SOARES, V. F. **Avaliação da resistência à antracnose em etnovariedades de *Phaseolus lunatus* L.** Mestrado (Dissertação), Universidade Federal de Alagoas, Maceió – AL, 2019, 125p.

SOLINO, A. J. S.; NETO, S. E. A.; SILVA, A. N.; RIBEIRO, A. M. A. S. Severidade da antracnose e qualidade dos frutos de maracujá-amarelo tratados com produtos naturais em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 57-66, 2012.

SOUSA, E. S.; SILVA, J. R. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MELO, M. P.; FEIJÓ, F. M.; MATOS, K. S.; LIMA, G. S. A.; BESERA JÚNIOR, J. E. A. *Colletotrichum* species causing anthracnose on lima bean in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 43, n. 1, p. 78-84, 2017.

SPONHOLZ, C.; FREIRE FILHO, F. R.; MAIA, C. B.; RIBEIRO, V. Q.; CARDOSO, M. O. **Reação de genótipos de feijão-caupi ao *Colletotrichum truncatum*.** Embrapa Meio Norte. Teresina – PI, ISSN 1413-1455, 2006, 18 p.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

THALINEAU, E.; FOURNIER, C.; GRAVOT, A.; WENDEHENNE, D.; JEANDROZ, S.; TRUONG, H. Nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* depends on plant genotype. **Plant Pathology**, v. 19, n. 3, p. 664-676, 2018.

THOMS, D.; LIANG, Y.; HANEY, C. H. Maintaining symbiotic homeostasis: how do plants engage with beneficial microorganisms while at the same time restricting pathogens? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 462-469 2021.

TOZZE JÚNIOR, H. J.; MELLO, M. B. A.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 77-79, 2006.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN-LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis – related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.

- WANG, L.; CAO, Y.; WANG, E. T.; QIAO, Y. J.; JIAO, S.; LIU, Z. S.; ZHAO, L.; WEI, G. H. Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Shaanxi Province. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 211-219, 2016.
- ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **The American Phytopathological Society**, v. 25, n. 2, 2002.
- ZILLI, J. E.; NETO, M. L. S.; FRANÇA JR, I.; PERIN, L.; MELO, A. R. Resposta do feijão-caupi à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a soja. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, n. 1, p. 739-742, 2011.