



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

César Freitas Ribeiro

**Metabolismo oxidativo na resistência do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a
*Colletotrichum lindemuthianum***

Florianópolis

2020

César Freitas Ribeiro

**Metabolismo oxidativo na resistência do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a
*Colletotrichum lindemuthianum***

Dissertação submetida ao Programa de Recursos
Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de Mestre em Recursos
Genéticos Vegetais
Orientador: Prof. Marciel J. Stadnik, Dr.
Coorientador: Mateus B. De Freitas, Dr

Florianópolis

2020

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

Ribeiro, César
Metabolismo oxidativo na resistência do feijoeiro comum
(Phaseolus vulgaris L.) a Colletotrichum lindemuthianum /
César Ribeiro ; orientador, Marciel Stadnik, coorientador, Mateus De
Freitas, 2020.
68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Fitopatologia. 3. Resistência
genética. 4. Antracnose do feijoeiro. 5.
Feijoeiro comum. I. Stadnik, Marciel. II. De Freitas, Mateus. III.
Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.
IV. Título.

César Freitas Riberio

**Metabolismo oxidativo na resistência do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a
*Colletotrichum lindemuthianum***

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Franceli Kulcheski, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Robson M. Di Piero Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Aline C. Velho, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Marciel J. Stadnik, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado à minha família e à minha noiva

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à CAPES pelo financiamento do atual projeto, concessão de bolsa para realiza-lo e possibilidade de aperfeiçoamento profissional.

Sou muito grato ao programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade e auxílio na formação de mestre.

Agradeço muito ao meu orientador Marciel J. Stadnik pela oportunidade, confiança e orientação do presente trabalho.

Agradeço também o meu coorientador Dr. Mateus De Freitas e ao meu colega/parceiro Marlon De Borba, pela total disponibilidade, ajuda e apoio em diversos momentos da minha pesquisa de mestrado.

Meus agradecimentos ao Dr. Daniel Winter Heck pelos ensinamentos de como manusear softwares importantes, como o R statistics. Agradeço também à bolsista Ana Geller pela ajuda em análises bioquímicas.

Obrigado também à banca, por aceitar participar da minha defesa de dissertação e pelas contribuições para melhora do atual trabalho.

Gostaria de agradecer também a todos os colegas de laboratório de fitopatologia que puderam, de alguma forma, me ajudar nas análises, apoio, estudos e companheirismo.

Gostaria de agradecer a minha família, meu pai César, minha mãe Leda e minha irmã Beatriz. Sem o apoio, carinho e criação deles eu não conseguiria chegar aonde estou.

Nos últimos agradecimentos era apenas namorada, hoje, agradeço muito a minha noiva Gabriela. Pelo total apoio, amor e carinho. Sem sua compreensão e companheirismo eu não conseguiria tudo que conquistei. Amo-te.

Obrigado a todos.

RESUMO

O feijão preto é um grão de importância econômica, social e nutricional para países da África, Ásia e América, como o Brasil. Um dos principais fatores bióticos limitantes à cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (*Cl*). Para o seu controle, a utilização de cultivar (cv.) resistente é o método mais utilizado. Contudo, os mecanismos de defesa associados à resistência genética do feijoeiro à antracnose ainda são pouco compreendidos. Entre esses mecanismos, as espécies reativas de oxigênio podem desempenhar um papel importante na determinação da resistência, sendo sua produção e degradação controladas por um complexo enzimático. Assim, o presente trabalho objetivou monitorar a atividade de enzimas guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD), bem como a quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), malonaldeído (MDA) e a frequência de células hipersensitivas em feijoeiro UFSC-01 (resistente) e cv. Uirapuru (suscetível) contra *Cl*. Para isso, plantas no estágio V3 foram inoculadas com suspensão de 10⁶ conídios/ml de *Cl*. Suas folhas foram amostradas para análises bioquímicas e microscópicas às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. Além disso, buscou-se a recuperação de *Cl* a partir de tecidos foliares com lesões e microlesões típicas de antracnose e de tecidos sem sintomas na forma de controle. As atividades de GPX, SOD e APX e as quantidades de H₂O₂ e MDA foram maiores em UFSC-01 inoculada, comparando-se com plantas desse genótipo não inoculadas, bem como com cv. Uirapuru inoculada ou não. As atividades dessas enzimas aumentaram no intervalo monitorado após a inoculação somente no genótipo UFSC-01. Em contraste, as atividades de enzimas oxidativas e as quantidades de MDA em cv. Uirapuru suscetível inoculada não diferiram estatisticamente das encontradas nos dois genótipos não inoculados. A atividade da CAT não foi alterada em ambos os genótipos, inoculados ou não. A frequência de células hipersensitivas aumentou em UFSC-01 inoculada se comparada à cv. Uirapuru inoculada e a feijoeiros não inoculados. O *Cl* foi recuperado de tecidos foliares de ambos os genótipos, porém com frequência inferior em tecidos de UFSC-01 com microlesões e superior em cv. Uirapuru com lesões. Diante do exposto, o aumento dos componentes do metabolismo oxidativo em feijoeiro resistente após a inoculação parece ser necessário para a resistência do feijoeiro à antracnose. A maior frequência de células hipersensitivas em linhagem resistente pode indicar maior restrição do fitopatógeno nas células deste genótipo. Já a recuperação de *Cl* de tecidos foliares em ambos os genótipos demonstra que há infecção por *Cl* também no genótipo resistente. No entanto, algum mecanismo impede o avanço da colonização do fitopatógeno em tecido de feijoeiro resistente. Assim, o presente trabalho sugere que o metabolismo oxidativo está associado à resistência e a mecanismos de defesa do feijoeiro a *Cl*, abrindo novas possibilidades para a compreensão da resistência do feijoeiro à antracnose.

Palavras chave: Resistência genética, metabolismo oxidativo, antracnose, feijoeiro comum.

ABSTRACT

Black beans are a food of economic, social and nutritional importance for countries in Africa, Asia and America, such as Brazil. One of the main biotic factors limiting the culture of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (*Cl*). For its control, the use of resistant cultivar (cv.) Is the most used method. However, the defense mechanisms associated with the genetic resistance of common beans to anthracnose are still poorly understood. Among these mechanisms, reactive oxygen species can play an important role in determining resistance, their production and degradation being controlled by an enzyme complex. Thus, the present study aimed to monitor the activity of guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), as well as the amount of hydrogen peroxide (H₂O₂), malonaldehyde (MDA) and the frequency of hypersensitive cells in beans UFSC-01 (resistant) and cv. Uirapuru (susceptible) against *Cl*. For this, plants in stage V3 were inoculated with a suspension of 10⁶ conidia/ml of *Cl*. Its leaves were sampled for biochemical and microscopic analysis at 0, 12, 24 and 48 hours after inoculation. In addition, the recovery of *Cl* was sought from leaf tissues with lesions and microlesions typical of anthracnose and in tissues without symptoms in the form of control. The activities of GPX, SOD and APX and the amounts of H₂O₂ and MDA were higher in inoculated UFSC-01, compared with plants of this non-inoculated genotype, as well as with cv. Uirapuru inoculated or not. The activities of these enzymes increased in the monitored interval after inoculation only in the UFSC-01 genotype. In contrast, the activities of oxidative enzymes and the amounts of MDA in cv. Susceptible Uirapuru inoculated not differ statistically from those found in the two non-inoculated genotypes. CAT activity was not altered in both genotypes, inoculated or not. The frequency of hypersensitive cells increased in inoculated UFSC-01 compared to cv. Inoculated Uirapuru and inoculated beans. *Cl* was recovered from leaf tissues of both genotypes, however with a lower frequency in UFSC-01 tissues with microlesions and higher in cv. Uirapuru with lesions. Considering the above, the increase in the components of oxidative metabolism in resistant beans after inoculation seems to be necessary for the resistance of the bean to anthracnose. The higher frequency of hypersensitive cells in resistant lineage may indicate greater restriction of the phytopathogen in the cells of this genotype. The recovery of *Cl* from leaf tissues in both genotypes shows that there is infection by *Cl* also in the resistant genotype. However, some mechanism prevents the advance of phytopathogen colonization in resistant bean tissue. Thus, the present work suggests that oxidative metabolism is associated with resistance and defense mechanisms of beans to *Cl*, opening new possibilities for understanding the resistance of beans to anthracnose.

Key words: Genetic resistance, oxidative metabolism, anthracnose, common bean.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Sintomas de antracnose do feijoeiro. Manchas necróticas na nervura e pecíolo do feijoeiro (A) e esporulação em vagem de feijoeiro (B). 17
- Figura 2 - Processo infeccioso (A) e estruturas (B) do *C. lindemuthianum*. C: conídio; Ap: apressório; Tg: tubo germinativo; Hpe: hifa de penetração V: vesícula de infecção; Hp: hifa primária (a-c: biotrofismo, primeiras 72 horas); Hs; hifa secundária (necrotrofismo, subsequente às 72 horas de infecção). Setas apontam a penetração da Hs na parede celular. . 18
- Figura 3 – Progresso da antracnose em feijoeiro cv. Uirapuru e UFSC-01 inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), dos 5 aos 15 dias após a inoculação. Linhas pontilhadas representam a regressão linear dos sintomas de Cl ao longo do tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. 37
- Figura 4 - Sintomas de antracnose na parte abaxial (A-B e D-F) e adaxial (C e G) de folhas de feijoeiro cv. Uirapuru (A-C) e UFSC-01 (D-G), aos 7 (A, D), 11 (B, F) e 15 (C, G) dias após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Setas indicam reação de hipersensibilidade (RH) observada apenas em linhagem resistente (F-G). 38
- Figura 5 - Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) em plantas de feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. 39
- Figura 6 - Atividade de catalase (CAT) em plantas de feijoeiro suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. 40
- Figura 7 - Atividade de ascorbato peroxidase (APX) em plantas de feijoeiro suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. 41

Figura 8 - Atividade de superóxido dismutase (SOD) em plantas de feijoeiro suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.41

Figura 9 – Quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. PF: Peso fresco de folhas.43

Figura 10 - Quantidade total de malonaldeído (MDA) em feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos, inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. PF: Peso fresco de folha.44

Figura 11 - Células hipersensíveis por cm² na superfície foliar de feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru), resistente (UFSC-01) e controle (não inoculados), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl). O controle representa plantas cv. Uirapuru e UFSC-01 não inoculadas. Linhas pontilhadas representam a regressão linear das medias dos genótipos ao longo do tempo. * indica diferença significativa entre as médias da inclinação da reta dos genótipos (teste de t-sudent, $P \leq 0,05$). Letras indicam diferença significativa entre genótipos no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). As barras indicam o desvio padrão da média.45

Figura 12 - Estrutura da infecção do *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl) e células hipersensitivas em cv. Uirapuru suscetível (A, C) e linhagem UFSC-01 resistente (B, D) s 24 (A, B) e 48 (C, D) horas após a inoculação (hai) com Cl. c: conídio; a: apressório; gt: tubo germinativo; hc: células hipersensíveis. Barras = 10 µm.46

Figura 13 – Frequência de *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl) recuperado de tecidos foliares com lesões (cv. Uirapuru) e microlesões (UFSC-01) típicas de antracnose e de tecidos assintomáticos de feijoeiros inoculados. dai: dias após a inoculação. Os dados foram

transformados pela raiz quadrada para aplicação de análises estatísticas. Letras indicam diferença significativa entre as médias (teste de Tukey, $P \leq 0,05$).....47

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Produção, produtividade e área plantada dos principais países produtores de feijão em 2017.	15
Tabela 2 - Produção, produtividade e área plantada de feijoeiro nos estados brasileiros no ano de 2017.	15
Tabela 3 - Cultivares diferenciadoras de raças de antracnose.	21
Tabela 4 - Estádios fenológicos para o feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.), cultivado em condições de casa-de-vegetação.	30
Tabela 5 - Escala descritiva da severidade da antracnose do feijoeiro.	32
Tabela 6 – Correlação de Pearson entre dados de guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), células com reação de hipersensibilidade (RH), severidade de antracnose (SEV) e, tecido isolado (ISO). * indica diferença significativa entre as correlações (teste de t-sudent, P≤0.05) e ** indica diferença significativa (teste de t-sudent, P≤0.01).	48

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1 - Atividade enzimática de guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em feijoeiros suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01), inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Cl) e não inoculados (mock), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas indicam diferença entre linhas (teste de Tukey, $P \leq 0,05$). *** indica diferença significativa no valor de $P \cong 0$, ** $\leq 0,01$ e * $\leq 0,05$ no teste ANOVA.	66
Apêndice 2 - Quantidade de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e malonaldeído (MDA) em feijoeiros suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Cl) e não inoculados (mock), às 0, 12, 24 e 48 horas após inoculação. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas indicam diferença entre linhas (teste de Tukey, $P \leq 0,05$). *** indica diferença significativa entre o valor de $P \cong 0$, ** $\leq 0,01$ e * $\leq 0,05$ no teste ANOVA.	67
Apêndice 3 - Células hipersensíveis em feijoeiros suscetíveis (cv. Uirapuru), resistentes (UFSC-01) e controle (feijoeiros não inoculadas), inoculados com não com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Cl), 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas indicam diferença entre linhas (teste de Tukey, $P \leq 0,05$). *** indica diferença significativa entre o valor de $P \cong 0$, ** $\leq 0,01$ e * $\leq 0,05$ no teste ANOVA.	67
Apêndice 4 - Frequência de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Cl) recuperado de tecidos foliares com lesões (cv. Uirapuru) e microlesões (UFSC-01) típicas de antracnose e de tecidos assintomáticos de feijoeiros inoculados. dai: dias após a inoculação. Os dados foram transformados pela aplicação da raiz quadrada ($\sqrt{x+0,1}$) e submetidos às análises estatísticas. Letras indicam diferença entre as médias (teste de Tukey, $P \leq 0,05$)	68
Apêndice 5 - Estimativa da população dos estados brasileiros que preferem o feijão preto para consumo.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX	Ascorbaro peroxidase
AsA	Ascorbato
CAT	Catalase
CCA	Centro de Ciências Agrárias
<i>Cl</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
DAB	Diaminobenzidina
dai	Dias após a inoculação
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GPX	Guaiacol peroxidase
ha	Hectare
hai	Horas após a inoculação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	<i>Cl</i> isolado/recuperado de tecido foliar
Kg	Quilograma
LabFitop	Laboratório de Fitopatologia
MDA	Malonaldeído
nm	Nanômetros
p	Peso
PF	Peso fresco
RH	Reação de hipersensibilidade
SC	Santa Catarina
SOD	Superóxido dismutase
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v	Volume

Sumário

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	14
1.2	ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>).....	16
1.2.1	Etiologia.....	16
1.2.2	Processo infeccioso	17
1.2.3	Disseminação.....	19
1.2.4	Controle da antracnose do feijoeiro.....	19
1.3	RESISTÊNCIA GENÉTICA DO FEIJOEIRO À ANTRACNOSE	20
1.4	MECANISMOS DE DEFESA NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS	21
1.5	METABOLISMO OXIDATIVO NA DEFESA DE PLANTAS A PATÓGENO.....	22
1.5.1	Enzimas associadas ao metabolismo oxidativo	23
1.5.1.1	<i>Guaiacol peroxidase (GPX EC 1.11.1.7)</i>	24
1.5.1.2	<i>Catalase (CAT EC 1.11.1.6)</i>	24
1.5.1.3	<i>Ascorbato peroxidase (APX EC 1.11.1.11)</i>	25
1.5.1.4	<i>Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1)</i>	25
1.5.2	Compostos bioquímicos associados ao metabolismo oxidativo	26
1.5.2.1	<i>Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	26
1.5.2.2	<i>Malonaldeído (MDA)</i>	26
1.5.3	Reação de hipersensibilidade (RH).....	27
1.6	METABOLISMO OXIDATIVO NA RESISTÊNCIA DE LEGUMINOSAS A <i>Colletotrichum</i>	28
1.7	OBJETIVOS.....	29
1.7.1	Objetivos gerais	29
1.7.2	Objetivos específicos.....	29
1.8	HIPÓTESES.....	29

2.	DESENVOLVIMENTO	30
2.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1.1	Obtenção e condições de cultivo de feijoeiro.....	30
2.1.2	Obtenção de inóculo e inoculação	30
2.1.3	Amostragem.....	31
2.1.4	Avaliação da severidade.....	31
2.1.5	Determinação da atividade enzimática.....	32
2.1.5.1	<i>Guaiacol peroxidase (GPX)</i>	33
2.1.5.2	<i>Catalase (CAT)</i>	33
2.1.5.3	<i>Ascorbato Peroxidase (APX)</i>	33
2.1.5.4	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	33
2.1.5.5	<i>Quantificação de proteínas totais</i>	34
2.1.6	Quantificação de compostos bioquímicos.....	34
2.1.6.1	<i>Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</i>	34
2.1.6.2	<i>Quantificação de malonaldeído (MDA)</i>	34
2.1.7	Determinação das células hipersensitivas	35
2.1.8	Frequência de <i>C. lindemuthianum</i> recuperado de tecidos foliares de feijoeiros.	35
2.1.9	Delineamento experimental e análises estatísticas	36
2.2	RESULTADOS	37
2.2.1	Severidade da antracnose	37
2.2.2	Atividade enzimática	38
2.2.2.1	<i>Guaiacol peroxidase</i>	38
2.2.2.2	<i>Catalase</i>	39
2.2.2.3	<i>Ascorbato peroxidase</i>	40
2.2.2.4	<i>Superóxido dismutase</i>	41
2.2.3	Compostos bioquímicos	42
2.2.3.1	<i>Peróxido de hidrogênio</i>	42

2.2.3.2	<i>Malonaldeído</i>	43
2.2.4	Células com reação de hipersensibilidade	44
2.2.5	Frequência de <i>C. lindemuthianum</i> recuperado de tecidos foliares de feijoeiros .46	
2.2.6	Correlação entre variáveis respostas	47
2.3	DISCUSSÃO	49
3	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICE A – Análises estatísticas dos dados obtidos em experimentos	66
	APÊNDICE B – Dados geográficos populacionais	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à ordem das Fabales, família das Fabaceae e gênero *Phaseolus*. Esta leguminosa é uma cultura de ciclo anual e de hábito de crescimento determinado e indeterminado (GRAHAM; RANALLI, 1997; DE RON et al., 2016). O feijoeiro apresenta sistema radicular pivotante, que é concentrado nos primeiros 20 cm de profundidade do solo, folhas trifoliadas, alternas e pecioladas, e inflorescência axilar (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991; GRAHAM; RANALLI, 1997).

P. vulgaris é originário de duas regiões da América, a Andina e a Mesoamericana (BROUGHTON et al., 2003; ASSEFA et al., 2019). Destes locais, surgiram cinco espécies (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus dumosus* Macfad., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray e *Phaseolus lunatus* L.) a qual o *P. vulgaris* é o mais produzido e consumido no mundo (SINGH, 2001; BROUGHTON et al., 2003; DE RON et al., 2016; PADDER et al., 2017; ASSEFA et al., 2019).

O feijão preto é importante fonte de alimento em diversos países. Uma das suas principais características nutricionais são a excelente fonte de proteína, carboidratos, minerais e vitaminas (BROUGHTON et al., 2003; ARNOLDI et al., 2015; ASSEFA et al., 2019). Devido o feijão ser ótima fonte de nutrientes, esse grão é também muito cultivado, comercializado e consumido em algumas regiões do mundo, como África, América do Sul e Central e Ásia. Estes atributos lhe conferem grande relevância econômica e social nas regiões envolvidas, desde cultivo até o consumo (BROUGHTON et al., 2003; ACOSTA-GALLEGOS; KELLY; GEPTS, 2007; ASSEFA et al., 2019).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, com 2.915.030 de toneladas colhidas em 2018, atrás de Myanmar e Índia (FAO, 2018). No entanto, entre os países que possuem maior produtividade, o Brasil se encontra na quarta colocação, com 1.027 kg/ha (Tabela 1), logo após a China e Estados Unidos (FAO, 2018). Esta baixa produtividade se deve a alguns fatores limitantes à cultura do feijoeiro comum, como fatores bióticos e abióticos (ASSEFA et al., 2019). Entre os fatores bióticos, pode-se destacar a presença de plantas daninhas, insetos pragas e fitopatógenos. Já entre os fatores abióticos, destacam-se estresse hídricos, térmicos, entre outros (SINGH, 2001; ASSEFA et al., 2019).

Tabela 1 - Produção, produtividade e área plantada dos principais países produtores de feijão em 2017.

País	Produção (ton)	Produtividade (kg/ha)	Área plantada (ha)
Índia	6.220.000	459	13.545.518
Myanmar	4.779.927	1.769	2.701.865
Brasil	2.915.030	1.027	2.837.697
EUA	1.700.510	2.084	815.850
China	1.324.407	1.783	749.860
Tanzânia	1.210.359	1.028	1.177.400

Fonte: FAO, 2017.

Dos estados brasileiros produtores, Santa Catarina (SC) se encontra na quinta posição com produção total de 123.623 toneladas do grão produzido (IBGE, 2017). Todavia apresenta considerável produtividade com 1.733 kg/há (Tabela 2), porém, ainda com grandes possibilidades de aumento. Dentro do cenário nacional, cerca de 60% da produção é oriunda da agricultura familiar, visto que os grandes produtores utilizam a cultura do feijoeiro comum para rotação de cultura diante de outras culturas, como soja e milho (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO, 2012). Com o investimento em incremento de parâmetros produtivos de cultivares de feijoeiros, há uma possibilidade de aumento na produtividade e produção tanto brasileira quanto catarinense.

Tabela 2 - Produção, produtividade e área plantada de feijoeiro nos estados brasileiros no ano de 2017.

Estado	Produção (ton)	Produtividade (kg/ha)	Área plantada (ha)
Paraná	600.108	1.524	787.388
Minas Gerais	522.338	1.602	664.452
Goiás	345.458	2.313	298.778
Mato Grosso	230.897	1.023	477.355
Santa Catarina	123.623	1.733	145.061

Fonte: IBGE, 2017.

Dentre as variedades de feijão, o feijão preto é preferido pela maioria da população dos estados de SC, Rio Grande do Sul, Paraná, Rio de Janeiro e Espírito Santo (COSTA et al., 2010). Assim, estima-se que parte da população destes estados, cerca de 51 milhões de brasileiros (Apêndice 5) preferem e consomem o feijão preto diariamente, dando-lhe importante valor econômico e social. Logo, através de lavouras de feijoeiros com altas produtividades (kg/ha), é possível suprir o alto consumo e demanda de feijão preto desta população, produzindo-o mais na mesma área.

1.2 ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO (*Colletotrichum lindemuthianum*)

A antracnose do feijoeiro é ocasionada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, que geralmente é um dos principais fitopatógenos do cultivo de feijão. Em lavouras de cultivares susceptíveis, este patógeno comumente é muito agressivo e pode comprometer até 100% da produção (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; PADDER et al., 2017).

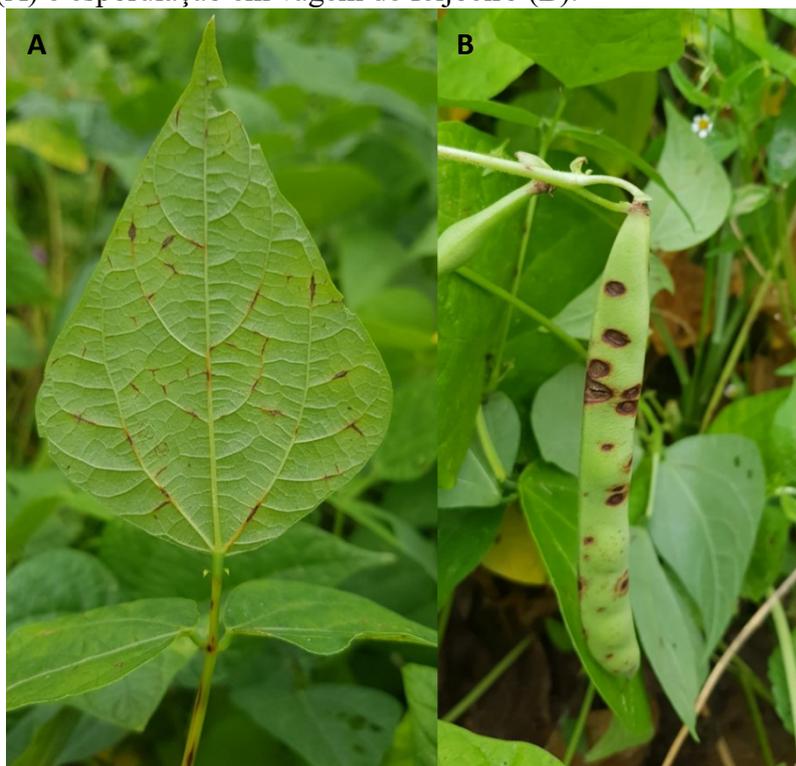
Os sintomas da doença podem ser visualizados em estágios fenológicos pós-emissão das folhas cotiledonares e em qualquer local da parte aérea das plantas, como folhas, caule, pecíolos e vagens. As lesões geralmente se iniciam na parte abaxial das folhas. Neste local, tem-se o início de manchas pardo-avermelhadas principalmente na nervura, para posteriormente progredirem em manchas café-escura mais longas à negra (Figura 1) (ALZATE-MARIN et al., 2007; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). No caule e pecíolos, é possível visualizar lesões ovaladas escuras e deprimidas (Figura 1). Já nas vagens, as lesões normalmente são arredondadas, deprimidas e de coloração marrom, podendo também apresentar lesões de centro claro ou rosa. Este sintoma é comum devido à esporulação do fungo, coberto por uma mucilagem (Figura 1) (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017).

1.2.1 Etiologia

Oriundo do telemorfo, ou fase perfeita, *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk f. sp. *phaseoli*, o *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner é um fungo mitospórico pertencente à classe dos Ascomycetos. Este fungo produz micélio septado, o qual após envelhecimento, evolui da cor hialiana para a quase negra (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MOHAMMED, 2013).

Os conídios podem ser cilíndricos ou oblongos, medem de 40 a 60µm e são produzidos sobre conidiósforos de coloração hialiana, no interior de acérvulos. Suas estruturas são envolvidas por mucilagem, uma massa gelatinosa de cor rosa (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017)

Figura 1 – Sintomas de antracnose do feijoeiro. Manchas necróticas na nervura e pecíolo do feijoeiro (A) e esporulação em vagem de feijoeiro (B).



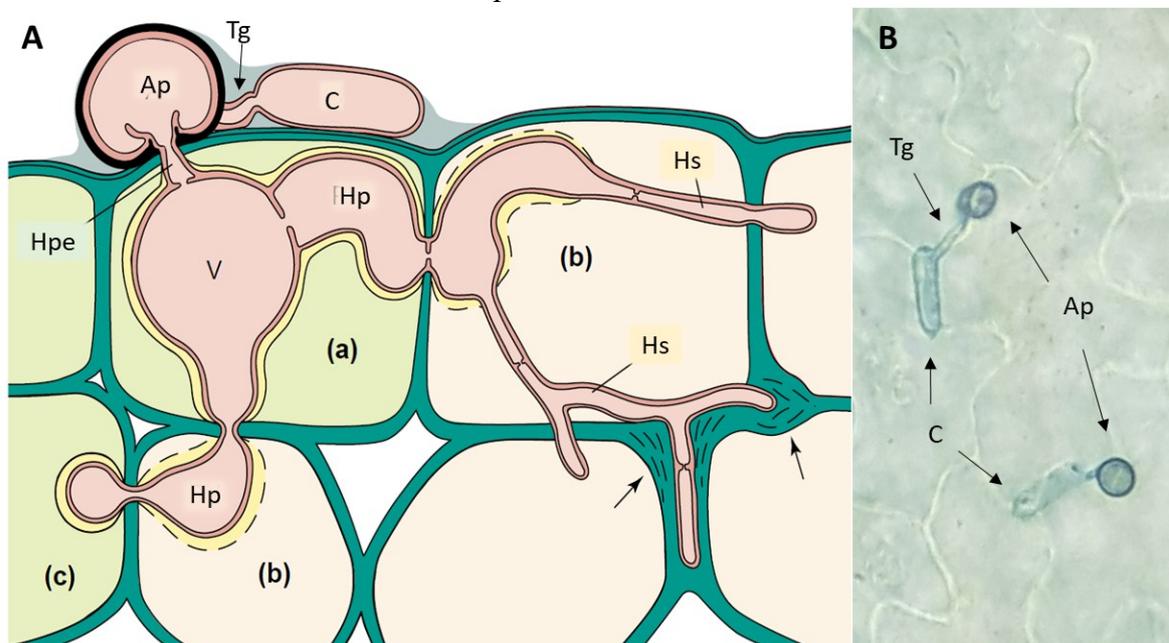
Fonte: autor

1.2.2 Processo infeccioso

O processo de infecção do *C. lindemuthianum* tem início após dispersão e deposição do seu conídio na superfície foliar do feijoeiro (PADDER et al., 2017). Sob condições favoráveis (temperatura e umidade), esse conídio germina (Figura 2 - C) e produz de um a quatro tubos germinativos (Figura 2 - Tg) (MENDGEN; HAHN, 2002; RAWLINGS; O'CONNELL; GREEN, 2007). Logo em sequência, um destes tubos se diferencia, sua ponta incha e, delimitada por um septo, origina-se o apressório (O'CONNELL; BAILEY, 1991; PERFECT et al., 1999; MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017). Em seguida, o apressório (Figura 2 - Ap) sofre maturação, melaniza-se e dá origem a um novo poro de penetração, onde há a emergência da hifa de penetração em direção ao interior da superfície da folha da planta. A penetração intracelular do fungo é via cutícula da epiderme e é realizada de forma conjunta de dois mecanismos distintos, secreção de enzimas responsáveis pela degradação da cutícula e força mecânica em sentido ao interior da célula do hospedeiro (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985; O'CONNELL; BAILEY, 1991; PADDER et al., 2016; SHAMS; JAVAN-NIKKHAH; MIRZADI GOHARI, 2020).

Vencidas as barreiras físicas da planta e com o sucesso do mecanismo de penetração, inicia-se o processo de colonização. O *Colletotrichum lindemuthianum* é um fungo hemibiotrófico (O'CONNELL; BAILEY, 1988; MOHAMMED, 2013; DE QUEIROZ et al., 2019), ou seja, sua fase inicial é biotrófica (Figura 2 – a) e ocorre nas primeiras 72 horas após infecção. Em contrapartida, a sua fase subsequente, a necrotrófica, tem início 72 horas após infecção (PADDER et al., 2016; SHAMS; JAVAN-NIKKHAH; MIRZADI GOHARI, 2020). A partir da hifa de penetração, a vesícula de infecção (Figura 2 - V) é formada a fim de manter o protoplasma do hospedeiro vivo, extrair nutrientes e estabelecer relações parasitáveis estáveis com o organismo vegetal (MOHAMMED, 2013; DE QUEIROZ et al., 2019; SHAMS; JAVAN-NIKKHAH; MIRZADI GOHARI, 2020). Da vesícula surgem as hifas primárias que continuam a colonização progressiva de novas células epidérmicas e do mesofilo. Oriundas das hifas primárias, as hifas secundárias dão início a fase necrotrófica de colonização (Figura 2 - b). Estas estruturas ramificam-se nas células dos hospedeiros, matando-as, ao consumir seus nutrientes de modo necrotrófica (O'CONNELL; BAILEY, 1991; PERFECT et al., 1999; PERFECT; GREEN; O'CONNELL, 2001; MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2016).

Figura 2 - Processo infeccioso (A) e estruturas (B) do *C. lindemuthianum*. C: conídio; Ap: apressório; Tg: tubo germinativo; Hpe: hifa de penetração V: vesícula de infecção; Hp: hifa primária (a-c: biotrofismo, primeiras 72 horas); Hs: hifa secundária (necrotrofismo, subsequente às 72 horas de infecção). Setas apontam a penetração da Hs na parede celular.



A - Adaptada: Mendgen e Hahn (2002). B - Foto: autor

1.2.3 Disseminação

A disseminação de *C. lindemuthianum* a feijoeiros ocorre de diferentes maneiras. A longas distâncias este fungo se dissemina por meio de sementes infectadas, enquanto que a curtas distâncias a disseminação é por respingos de chuvas sobre vagens contendo esporulação. Sua sobrevivência é frequente em forma de micélio no tegumento da semente, ou em restos culturais, ambos propagados a safras subsequentes (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; KELLY; VALLEJO, 2004). Já o desenvolvimento da doença, após hospedeiro infectado, é favorecido em temperaturas entre 13°C e 26°C, juntamente com alta umidade relativa do ar (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; MOHAMMED, 2013)

Em consequência dos métodos de disseminação da antracnose serem via semente, Montemor et al. (2012) observaram, após teste fitossanitário com diferentes lotes de sementes de feijão preto de SC, alta incidência de *Cl*. Os autores sugerem a necessidade de adoção de medidas de controle, visando reduzir a incidência do fitopatógeno na semente genética ou básica.

1.2.4 Controle da antracnose do feijoeiro

Existem diferentes métodos de controle da antracnose do feijoeiro, os mesmos vão desde evitar a disseminação até efetuar o controle pós-infecção. Contudo, nem todos apresentam boa eficiência e podem ser agravados por técnicas de cultivo que beneficiam a doença (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; PADDER et al., 2017). O controle químico, através de fungicidas, pode evitar a disseminação de sementes infectadas via tratamento de semente, ou pode apresentar efeito curativo, utilizando-os pós-infecção. No entanto, o uso destes defensivos agrícolas geram alto custo ao produtor, nem sempre são eficientes e podem gerar resíduos ao meio ambiente e ao grão de feijão produzido (MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017). A monocultura pode manter o inóculo na área de plantio, por isso a rotação de cultura pode evitar a presença da fonte de inóculo, assim como interromper a ciclo de vida do *C. lindemuthianum* (SINGH; SCHWARTZ, 2010; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Porém, após a introdução do fitopatógeno na área de cultivo, a rotação de cultura se torna ineficaz e perde sua eficiência (MOHAMMED, 2013).

1.3 RESISTÊNCIA GENÉTICA DO FEIJOEIRO À ANTRACNOSE

O controle genético, através do uso de cultivar resistente, é o método considerado mais eficiente, menos oneroso e não gera resíduo ao meio ambiente (MAHUKU et al., 2002; KELLY; VALLEJO, 2004; DAVIDE; SOUZA, 2009; MOHAMMED, 2013). Dentro do uso de genótipos resistente, sabe-se que o *P. vulgaris* apresenta a resistência monogênica (ou vertical) a *C. lindemuthianum*, ou seja, está presente na planta genes “R” de resistência. O mesmo o confere resistência raça-específica, não podendo proporcionar o controle a todas as raças do agente causal da antracnose (BALARDIN; KELLY, 1998; GEFFROY et al., 2008; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; SHAMS; JAVAN-NIKKHAH; MIRZADI GOHARI, 2020).

O *C. lindemuthianum* possui alta variabilidade genética, tendo sido identificado em torno de 100 raças distribuídas pelo mundo (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; DE QUEIROZ et al., 2019) e 50 raças pelo Brasil (DAVIDE; SOUZA, 2009). Existem alguns fatores que podem indicar esta variabilidade genética, como a coevolução e origem do feijoeiro e do *Cl* partirem da mesma região, mesoamerica e américa andina (MAHUKU; RIASCOS, 2004). Outro fator é a distribuição e adaptabilidade de ambos seguirem para diferentes regiões do mundo (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; PADDER et al., 2017). Porém, a alta variabilidade deste fitopatógeno é capaz de impactar na resistência genética do feijoeiro, que pode ser quebrada pelo polimorfismo da virulência que sofre populações de *Cl* (PADDER et al., 2016).

Para classificação das raças de *C. lindemuthianum* encontradas em lavouras de feijoeiro, foi proposta a utilização de 12 cultivares diferenciadoras, as quais cada uma possui um código binário e um ou mais genes de resistência, intitulado de *Co*- (Tabela 3). Assim, raças isoladas recebem uma numeração, que consiste na somatória do código binário da(s) cultivar(es) que, após inoculação, apresentou a doença (Tabela 3) (KELLY; VALLEJO, 2004; GEFFROY et al., 2008; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Mesmo assim, não apenas em lançamentos de novas cultivares e linhagens, mas também em programas de melhoramento de feijoeiros à antracnose, o controle via resistência genética vêm perdendo a eficiência devido à grande variabilidade genética e capacidade adaptativa do *C. lindemuthianum* (KELLY; VALLEJO, 2004; DAVIDE; SOUZA, 2009; OBLESSUC et al., 2012; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; PADDER et al., 2017; DE QUEIROZ et al., 2019).

Tabela 3 - Cultivares diferenciadoras de raças de antracnose.

cv. Diferenciadora	Gene	Gene pool	Código binário
Michelite	---	MA	1
Michigan Dark Red Kidney	Co-1	A	2
Perry Morrow	Co-1 ³	A	4
Cornnel 49242	Co-2	MA	8
Widusa	---	MA	16
Kaboon	Co-1 ²	A	32
Mexico 222	Co-3	MA	64
PI207262	Co-4 ³ , Co-9	MA	128
TO	Co-4	MA	256
TU	Co-5	MA	512
AB 136	Co-6, co-8	MA	1024
G 2333	Co-4 ² , Co-5, Co-7	MA	2048

*Adaptado Kelly e Vallejo (2004). MA: Mesoamericano. A: Andino. cv: Cultivar

Os loci de características quantitativa (“Quantitative Trait Loci” - QTL) são regiões dos cromossomos capazes de determinar uma característica fenotípica, como a resistência a doenças (GONZÁLEZ et al., 2015). Entre os genes da resistência do feijoeiro à antracnose, existem QTLs conhecidos que controlam a resistência a diferentes raças, sendo 11 grupos de ligações (GONZÁLEZ et al., 2015; MEZIADI et al., 2016). Os QTLs em feijoeiros controlam a resistência e podem estar associados a ativação de mecanismos de defesa (PADDER et al., 2017).

No Brasil, há uma maior frequência das raças 65, 73 e 81 de *C. lindemuthianum* nas lavouras de feijoeiro (DAVIDE; SOUZA, 2009). Da mesma maneira, Santa Catarina possui também um predomínio da raça 65, seguida pela raça 73 (GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008). Todavia, obter informações sobre mecanismos de resistência de feijoeiro contra a raça 73 é interessante, visto que, uma variedade resistente a esta raça é também resistente às raças de numeração inferiores (Tabela 3).

1.4 MECANISMOS DE DEFESA NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A PATÓGENOS

A resistência de plantas a fitopatógenos englobam diferentes mecanismo de defesa. Entre eles, destacam-se os mecanismos estruturais e bioquímicos, ambos podem estar presentes ou serem ativados depois da interação com o patógeno, sendo caracterizado como pré ou pós-formado (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; AGRIOS, 2005).

Os mecanismos estruturais consistem em barreiras físicas que impedem ou atrasam a penetração e colonização do patógeno, como tricomas e cutícula, os quais são classificados como pré-formados. Já a lignificação e a formação de papilas estão presentes no grupo dos estruturais pós-formados. De outra forma, os mecanismos bioquímicos são substâncias químicas com ação antagonista e antimicrobiana ao patógeno. Elas podem ser pré-formados, como fenóis e glicosídeos, ou pós-formados, como a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; ODJAKOVA; HADJIIVANOVA, 2001; AGRIOS, 2005; GARCION et al., 2014).

1.5 METABOLISMO OXIDATIVO NA DEFESA DE PLANTAS A PATÓGENO

Logo após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, a planta pode desenvolver uma série de respostas bioquímicas e enzimáticas, alterando seu metabolismo. Essa mudança metabólica tem como objetivo iniciar uma sinalização de defesa da planta, ativar mecanismos de defesa e tentar impedir a infecção do fitopatógeno (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; O'BRIEN et al., 2012). Assim, a alteração do metabolismo oxidativo pode torna-se uma das primeiras respostas na linha de defesa das plantas, sendo capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma forte explosão oxidativa (TORRES; JONES; DANGL, 2006; BOLWELL; DAUDI, 2009; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016).

A explosão oxidativa é comumente referida ao rápido acúmulo de EROs nos tecidos e células vegetais, a partir dela há uma alteração na mobilização de proteínas, influxo de íons, fosforilação e mudança de pH (TORRES, 2010; SHARMA et al., 2012). As EROs são moléculas derivadas do Oxigênio (O_2), de alta reatividade, que incluem os radicais livres ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e moléculas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (SHETTY et al., 2008; O'BRIEN et al., 2012; SHARMA et al., 2012). As EROs nos organismos vegetais são responsáveis por diferentes funções durante a interação planta-patógeno. Essas funções vão desde ação antimicrobiana ao patógeno, até sinalização para ativação de genes ou mecanismos de defesa. Após sinalização, grandes quantidades de EROs podem possuir ação tóxica às células do próprio hospedeiro, resultando em morte celular e em reação de hipersensibilidade (MUR et al., 2008; SHETTY et al., 2008; TORRES, 2010; SHARMA et al., 2012; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016). Entre as EROs, o

peróxido de hidrogênio possui importante papel na atividade antimicrobiana e sinalização da célula em resposta às invasões microbianas. Além de, na maioria das vezes ser a molécula de EROs produzida em maior quantidade e com maior tempo de vida útil, de aproximadamente de 1ms (QUAN et al., 2008; O'BRIEN et al., 2012; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016; ČERNÝ et al., 2018).

1.5.1 Enzimas associadas ao metabolismo oxidativo

Para que as EROs possam ser produzidas ou degradadas e consigam desempenhar seus papéis, um complexo de enzimas devem ser ativados ou inativados, afim de aumentar ou diminuir a produção e quantidade de EROs, ou até mesmos degradá-las, resultando em desintoxicação de EROs (“scaveging”) (SHARMA et al., 2012). Esse processo é importante para determinar o sucesso, ou não, da infecção do patógeno, através da autodestruição ou manutenção da viabilidade da célula via balanço redox presente nesse organismo vivo. Ao se autodestruir, a célula com a presença do fitopatógeno acaba o impedindo de progredir e continuar a colonização de patógenos biotróficos (BREUSEGEM; DAT, 2006; TORRES, 2010; BALINT-KURTI, 2019).

Algumas são as enzimas produtoras de EROs, destacando-se a superóxido dismutase (SOD) e algumas classes da peroxidase, como a guaiacol peroxidase (GPX) (WOJTASZEK; TRETOWAN; BOLWELL, 1997; ALMAGRO et al., 2009; SHARMA et al., 2012; ČERNÝ et al., 2018). A maioria, a partir de estímulos, produz H_2O_2 e outros EROs importantes para sinalização, ação antimicrobiana e intoxicação celular (BOLWELL; DAUDI, 2009; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016). Outras enzimas são encarregadas de fazer a desintoxicação de EROs, entre elas, pode-se destacar a catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (O'BRIEN et al., 2012; SHARMA et al., 2012; ČERNÝ et al., 2018). Essa desintoxicação é crucial para eliminar e diminuir a quantidade de H_2O_2 , outros EROs e manter a célula vital. No entanto, permite a proliferação do agente fitopatogênico biotrófico em células vivas e garante o sucesso da doença (QUAN et al., 2008; SHETTY et al., 2008; TORRES, 2010).

Desta maneira, as enzimas de produção e de desintoxicação de EROs apresentam papel importante no metabolismo oxidativo e mecanismo de defesa de plantas. Na forma de manter o equilíbrio redox da célula hospedeira e resultar em manutenção da viabilidade ou autodestruição dela (TORRES, 2010; O'BRIEN et al., 2012; SHARMA et al., 2012; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016).

1.5.1.1 Guaiacol peroxidase (GPX EC 1.11.1.7)

A guaiacol peroxidase (GPX EC 1.11.1.7) é uma enzima pertencente a classe III das peroxidase (ALMAGRO et al., 2009; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016). Formada por heme proteínas, a GPX pode produzir H_2O_2 na presença de grande quantidade de $O_2^{\cdot-}$ ou de outro forte agente redutor (O'BRIEN et al., 2012). A ação da peroxidase é formada por dois ciclos, ciclo peroxidase e ciclo oxidase (peroxidase cycle e oxidase cycle). A partir do ciclo oxidase, a enzima ferrosa pode reagir como o doador de elétron ($O_2^{\cdot-}$ ou outro) e produzir o H_2O_2 , possibilitando assim a peroxidase voltar ao seu estado fundamental (O'BRIEN et al., 2012).

Caracterizada como a principal enzima produtora de H_2O_2 em culturas de células do feijoeiro (WOJTASZEK; TRETOWAN; BOLWELL, 1997; BLEE et al., 2001; BOLWELL et al., 2002), a GPX está localizada no apoplasto ou parede celular dos organismo vegetais (O'BRIEN et al., 2012; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016). Além de precursora na produção de H_2O_2 , é também classificada como proteína relacionada a patogênese (PR) e está também relacionada com lignificação e reforço da parede celular (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; BOLWELL et al., 2002; ALMAGRO et al., 2009).

1.5.1.2 Catalase (CAT EC 1.11.1.6)

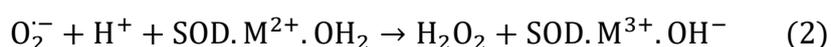
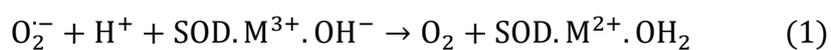
Primeira enzima antioxidante a ser descoberta, a catalase (CAT EC 1.11.1.6) converte duas moléculas de H_2O_2 em oxigênio e água (ANJUM et al., 2016). Além de alta especificidade a peróxido de hidrogênio, a CAT é energeticamente eficiente por não necessitar de agente redutor para seu pleno funcionamento (TORRES, 2010; SHARMA et al., 2012). Localizada geralmente em peroxissomos, a catalase pode ser também encontrada em mitocôndrias e citosol (ANJUM et al., 2016; ČERNÝ et al., 2018) e possui ação não apenas no metabolismo cotidiano das plantas, mas também na defesa de plantas contra estresse bióticos e abióticos (MHAMDI et al., 2010; SHARMA et al., 2012; ČERNÝ et al., 2018).

1.5.1.3 *Ascorbato peroxidase (APX EC 1.11.1.11)*

O ascorbato peroxidase (APX EC 1.11.1.11) é uma heme-proteína pertencente a classe I da família das peroxidases (SHARMA et al., 2012; ANJUM et al., 2016), com importante função de desintoxicação de EROs na célula (TORRES, 2010; ANJUM et al., 2016; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016). Seu principal papel no metabolismo oxidativo é degradar o peróxido de hidrogênio, reduzindo-o à água e, consequentemente, gerando duas moléculas de monode-hidroascorbato (MDHA). Para isso, a APX utiliza duas moléculas de ascorbato (AsA) no ciclo AsA-GSH (ciclo Ascorbato-Glutathiona) (SHARMA et al., 2012; ANJUM et al., 2016). A APX, dependendo da sua isoforma, localiza-se no citosol, mitocôndria ou peroxissomo e pode também estar associada a mecanismo de defesa a fatores abióticos, como salinidade e estresses hídricos (SHARMA et al., 2012; ANJUM et al., 2016).

1.5.1.4 *Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1)*

A Superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1) é uma enzima do grupo das metaloenzimas que catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 (SHARMA et al., 2012; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016; ČERNÝ et al., 2018). É considerada a principal enzima atuante na primeira linha de defesa da planta e sua classificação é realizada conforme seus cofatores metálicos: cobre, manganês e zinco (MILLER, 2012; SHARMA et al., 2012). Dependendo da sua isoforma, a SOD pode ligar-se ao agente redutor (Cu, Mn, Zn), reduzi-lo e mantê-lo na sua forma reduzida (1). Após esta reação (1), a isoforma reduzida, em conjunto com a SOD, pode reagir, oxidar e formar o H_2O_2 (2) (MILLER, 2012; GILL et al., 2015). A SOD, dependendo do seu cofator, pode estar localizada na mitocôndria, citosol, cloroplasto ou peroxissomos (MILLER, 2012; SHARMA et al., 2012). Devido a sua grande capacidade de produção de H_2O_2 e rápida ativação em resposta a agentes estressores, a SOD é imprescindível durante a alteração do metabolismo oxidativo associado aos mecanismo de defesa da planta a patógenos (O'BRIEN et al., 2012; GILL et al., 2015; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016).



1.5.2 Compostos bioquímicos associados ao metabolismo oxidativo

Existem inúmeros compostos bioquímicos associados ao metabolismo oxidativo da planta (KOMBRINK; SOMSSICH, 1995; O'BRIEN et al., 2012; SHARMA et al., 2012). Além de sinalizadores, estes compostos podem servir como indicadores e substâncias tóxicas a fitopatógenos ou às células hospedeiras. Entre eles, pode-se destacar o H_2O_2 e o malonaldeído, que é produto e indicador da peroxidação lipídica (GARG; MANCHANDA, 2009; FARMER; MUELLER, 2013).

1.5.2.1 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Geralmente sintetizado pela GPX e SOD, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula derivada do $O_2^{\cdot-}$ que pode desempenhar várias funções na planta (QUAN et al., 2008; SHARMA et al., 2012). Em baixas concentrações, o H_2O_2 normalmente exerce papel de molécula sinalizadora, já em altas concentrações pode causar dano oxidativo à célula, orquestrando a morte celular programada e à reação de hipersensibilidade (BREUSEGEM; DAT, 2006; MUR et al., 2008; QUAN et al., 2008). Outro importante papel desenvolvido pelo H_2O_2 , é a ação antimicrobiana, contudo, isso irá depender de fatores como concentração de H_2O_2 , sensibilidade do patógeno e idade da célula (SHETTY et al., 2008). Assim, a quantidade de H_2O_2 torna-se importante para determinar não apenas em qual momento será a ação contra o fitopatógeno, mas também como será a ação.

1.5.2.2 Malonaldeído (MDA)

Produto da peroxidação lipídica, o malonaldeído (MDA) é resultado da oxidação de lipídios da membrana celular (MUR et al., 2008; GARG; MANCHANDA, 2009). Importante nesse processo, algumas EROs possuem radicais livres que podem ser capturados por ácidos graxos poli-insaturados e os oxidarem. Esses ácidos graxos são componentes estruturais dos lipídios da membrana celular (MUR et al., 2008; GARG; MANCHANDA, 2009; SHARMA et al., 2012). Após esta reação, o dano oxidativo causado à membrana celular resulta em uma desestruturação da célula, colapsando-a e resultando em morte celular (MUR et al., 2008; SHARMA et al., 2012). Logo, a morte

celular devido à peroxidação lipídica possibilita conter o fitopatógeno presente na célula, restringindo sua colonização, ou até, interrompendo-a por completo.

1.5.3 Reação de hipersensibilidade (RH)

A reação de hipersensibilidade (RH) é definida basicamente pela morte celular localizada onde ocorre a infecção do patógeno e resulta na supressão do progresso da doença (MUR et al., 2008). Antecedente a RH, uma série de mudanças metabólicas ocorrem com objetivo de sinalizar e desencadear a morte celular programada (GARG; MANCHANDA, 2009; KÜNSTLER et al., 2016). Após o reconhecimento e sinalização devido à presença do patógeno, o metabolismo oxidativo se altera para produzir EROs ou desintoxicá-las de células. Diante do exposto, a produção e acúmulo de altos níveis de H_2O_2 é um fator importante para a morte celular, que resulta em RH (BREUSEGEM; DAT, 2006; MUR et al., 2008; KÜNSTLER et al., 2016). Outro fator que pode gerar a RH é alta peroxidação lipídica, na qual ocorre o dano oxidativo à membrana e morte celular na região infectada (GARG; MANCHANDA, 2009; BALINT-KURTI, 2019).

Ao se autodestruir a célula pode restringir o progresso do patógeno, ao impedir três diferentes processos infecciosos. O primeiro é quando a célula com a estrutura do fitopatógeno se autodestrói. O segundo consiste na morte de células da superfície onde o apressório do conídio empenha-se na penetração. O último processo é quando as células ao redor de uma célula infectada, se autodestroem para evitar a colonização e proliferação do fitopatógeno à células adjacentes (MUR et al., 2008; KÜNSTLER et al., 2016; BALINT-KURTI, 2019). No entanto, o sucesso da RH em restringir o progresso da doença depende muito do tempo de identificação, sinalização e reação das células da planta após interação planta-patógeno. Caso as células do hospedeiro se atrasem muito para reagir, a RH pode ser ineficiente e o patógeno pode vencer este mecanismo, causando a doença (GARG; MANCHANDA, 2009; KÜNSTLER et al., 2016). Assim, a RH pode ser fator crucial para determinar resistência ou suscetibilidade de algumas plantas a determinados patógenos (KÜNSTLER et al., 2016).

1.6 METABOLISMO OXIDATIVO NA RESISTÊNCIA DE LEGUMINOSAS A *Colletotrichum*

Diferentes trabalhos apontam a alteração do metabolismo oxidativo associado a mecanismos de defesa de leguminosas a *Colletotrichum*. Torregrosa et al. (2004) observaram, em patossistema *Medicago truncatula* – *C. trifolii*, a maior presença de peróxido de hidrogênio em linhagens resistentes infectadas do que em linhagens suscetíveis. A alfafa é planta modelo para estudos em leguminosas. Em pesquisas no patossistema *Vigna unguiculata* – *C. gloeosporioides*, também foi observada a maior presença de H₂O₂ em folhas de variedades resistentes infectadas de feijão-de-cordado, do que em suscetíveis (BARRETO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014). Outros trabalhos também mostram a presença de H₂O₂ em células pela resposta ao *C. lindemuthianum*. Por exemplo, pesquisas realizadas com culturas de células de feijoeiro tratadas com elicitores *C. lindemuthianum* mostraram aumento na atividade de peróxido de hidrogênio e GPX nas amostras celulares (WOJTASZEK; TRETOWAN; BOLWELL, 1997; BLEE et al., 2001; BOLWELL et al., 2002).

Alguns trabalhos nos patossistemas entre leguminosa - *Colletotrichum* também relataram a ação de enzimas associadas às EROs. Por exemplo, Oliveira et al. (2014) encontraram na defesa de feijão-de-corda a *C. gloeosporioides*, alterações na atividade de SOD, CAT, APX e GPX em genótipo resistente e suscetível. Esses resultados foram condizentes ao maior acúmulo de H₂O₂. Variações nestas enzimas foram vistos não somente interação de leguminosa - *Colletotrichum* (TORREGROSA et al., 2004; BARRETO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014; WANG et al., 2017) e feijoeiro comum a *Colletotrichum* (DE FREITAS; STADNIK, 2012; CHAKRABORTY et al., 2019), mas também na interação de morango (FANG et al., 2012), melão (GE; BI; GUEST, 2013) e maçã a *Colletotrichum* (VELHO et al., 2016).

Logo, entender melhor o metabolismo oxidativo do feijoeiro comum a *Colletotrichum* torna-se interessante para compreensão da sua possível associação aos mecanismos de defesa dessa planta. Com base nos dados obtidos é possível relatar a atuação do metabolismo oxidativo na defesa *P. vulgaris* a *C. lindemuthianum* e gerar dados para futuras pesquisas moleculares e programas de melhoramento do feijoeiro comum à antracnose.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivos gerais

Investigar a atividade das enzimas guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD), a quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA), e o número de células hipersensitivas em genótipo de feijoeiro resistente e suscetível, na interação com *C. lindemuthianum*.

1.7.2 Objetivos específicos

Avaliar a severidade de antracnose em feijoeiro resistente e suscetível

Determinar a atividade das enzimas GPX, CAT, APX e SOD em feijoeiro resistente e suscetível após a inoculação com *C. lindemuthianum*.

Quantificar o H_2O_2 e o MDA em feijoeiro resistente e suscetível, após a inoculação com *C. lindemuthianum*.

Determinar, via microscopia, a número de células hipersensitivas em feijoeiro resistente e suscetível, após a inoculação com *C. lindemuthianum*.

Verificar a frequência de *C. lindemuthianum* recuperado de tecidos com lesões e microlesões típicas de antracnose e sem sintomas de feijoeiro resistente e suscetível.

1.8 HIPÓTESES

Feijoeiro resistente tem a atividade de enzimas GPX, CAT, APX e SOD e a quantidade de H_2O_2 e o MDA maior que feijoeiro suscetível, após a inoculação com *C. lindemuthianum*.

Feijoeiro resistente tem maior número de células hipersensitivas do que feijoeiro suscetível, após a inoculação com *C. lindemuthianum*.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia (LabFitop) e em casa-de-vegetação no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis-SC.

2.1.1 Obtenção e condições de cultivo de feijoeiro

Para realização dos experimentos, utilizou-se as variedades de feijão preto da linhagem UFSC-01 e cultivar (cv.) Uirapuru (DE FREITAS; STADNIK, 2012). Assim, foram semeadas oito sementes, em vaso plástico preto 3L (Plasticofer Ltda.), de forma equidistante entre si e a 2,5 cm de profundidade. O substrato utilizado foi uma mistura homogênea de solo (50%) e vermiculita (50%). Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e irrigados conforme necessidade hídrica da cultura.

Após a germinação das sementes, plantas no estágio V2 (Tabela 4) foram desbastadas com objetivo de se obter apenas três plantas em estágio V3 por vaso.

Tabela 4 - Estádios fenológicos para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivado em condições de casa-de-vegetação.

Estádio	Dias	Características
V0	3	Germinação iniciada em 50% das sementes.
V1	5	Cotilédones de 50% das plantas completamente desenvolvidos.
V2	9	Folhas primárias de 50% das plantas completamente desenvolvidas.
V3	13	Primeiro trifólio de 50% das plantas completamente desenvolvido.
V4	23	Terceiro trifólio de 50% das plantas completamente desenvolvido.

Adaptado de Dourado Neto e Fancelli (2000).

2.1.2 Obtenção de inóculo e inoculação

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl) utilizado foi obtido do isolado monospórico MANE 001-03 (Micoteca Anne-Lore Schroeder – CCA - UFSC), raça 73. O fungo foi cultivado em placas de petri contendo meio de cultura BDA (Batata dextrose ágar, 38g/L). Para produção de inóculo, o Cl então foi repicado para vagens em tubos de

ensaios contendo ágar-agua (20g/L; 5mL/tubo) para suportá-las de forma ereta. Os tubos foram incubados em câmara de crescimento com temperatura de 23 ± 1 °C e 12 h de fotoperíodo, durante 15 dias (PAULERT et al., 2009).

Após esporulação do *Cl* em vagens, foi preparado uma suspensão de esporos através da adição de água destilada em vagens. Por fim, a concentração de conídios foi determinada com auxílio de câmara de Neubauer e ajustado para $1,0 \times 10^6$ conídios/ml. A solução de esporos foi centrifugada por três vezes, à 8,2 G por 10 minutos à 21 °C. A cada centrifugação a água da solução de esporos foi substituída por nova água destilada para retirada de mucilagem do esporo.

O inóculo foi aspergido com auxílio de borrifador, aplicando-se aproximadamente 5 ml de inóculo por planta, as mesmas foram inoculadas quando atingiram o primeiro trifólio completamente expandido (V3 - Tabela 4). Em seguida, os feijoeiros foram realocados para câmara úmida onde permaneceram por 48 horas, sob umidade e temperatura controlada (99% UR e 21 ± 2 °C). Durante este período, foram retiradas apenas as plantas específicas de cada tempo de amostragem, para a coleta de amostras. Por fim, as plantas foram novamente realocadas para casa-de-vegetação para retomarem seu ciclo de crescimento e serem avaliadas quanto a severidade.

2.1.3 Amostragem

As amostragens foram realizadas às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Do primeiro trifólio da planta de feijoeiro (em estágio V3), foi retirado o folíolo direito para quantificação de compostos bioquímicos, o folíolo esquerdo para determinação de atividades enzimáticas e o folíolo central para determinação de células hipersensitivas.

Dos folíolos centrais, foram retirados dois discos foliares (9 mm de diâmetro) de cada amostra. As demais amostras foram retiradas, imediatamente pesadas, acondicionadas em sacos plásticos e congeladas em nitrogênio líquido, para posteriormente serem armazenada em freezer a -80°C.

2.1.4 Avaliação da severidade

A avaliação da severidade foi realizada conforme a escala de notas proposta por Rava *et al* (1993). As plantas inoculadas foram avaliadas aos 5, 7, 9 11, 13 e 15 dias após

a inoculação (dai). Esta escala permite avaliar a severidade da antracnose no feijoeiro a partir dos seus sintomas, atribuindo-lhe uma nota de 1 a 9 (Tabela 5).

Tabela 5 - Escala descritiva da severidade da antracnose do feijoeiro.

Notas	Descrição dos sintomas
1	Ausência de sintomas.
2	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas.
3	Maior frequência dos sintomas descritos no grau 2, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.
5	Maior frequência dos sintomas descritos no grau 4, até 3% das nervuras afetadas.
6	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces da folha, presença de algumas lesões em ramos e pecíolos.
7	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesofilo adjacente que se rompe. Lesões abundantes em ramos e pecíolos.
8	Manchas necróticas em quase todas as nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento da planta. Lesões muito abundantes em ramos e pecíolos.
9	Maioria das plantas mortas.

Adaptada Rava *et al* (1993).

2.1.5 Determinação da atividade enzimática

As atividades das enzimas GPX, CAT, APX e SOD foram determinadas conforme De Freitas e Stadnik (2015), com algumas modificações. Com o objetivo de se obter um extrato proteico homogêneo, as amostras foram maceradas em cadinho de porcelana (100 mL, Nalgon, Brasil) com a presença de nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado tampão de extração fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) na proporção de 1:5 em peso (p) / volume (v). Esse tampão de extração continha 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a obtenção do extrato bruto, o mesmo foi transferido para microtubo e centrifugado (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha) a 12.000 rpm por 30 minutos a 1°C. O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e acondicionado em gelo para determinação de atividade enzimática.

As determinações da atividade de enzimas foram realizadas, via espectrofotometria, pela leitura da reação entre o extrato da amostra e o tampão de reação específico para cada enzima, em microplacas, no leitor microplacas (Spectramax

paradigm multi-mode detection platform). A unidade utilizada para determinação enzimática foi $\mu\text{Katal/mg}$ de proteína.

2.1.5.1 *Guaiacol peroxidase (GPX)*

A atividade enzimática de guaiacol peroxidase foi determinada pela leitura da reação de 7 μL de extrato enzimático e 193 μL de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 6,0) contendo 12,6 mM de H_2O_2 e 0,31 M de guaiacol. A reação foi mensurada a absorvância de 470 nanômetros (nm), durante 3 minutos, a 30 °C (DE FREITAS; STADNIK, 2012). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $\epsilon = 26.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.1.5.2 *Catalase (CAT)*

Para a mensuração da atividade de catalase, foram adicionados 12 μL de extrato enzimático e 180 μL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo 16 mM de H_2O_2 . A leitura foi feita a 240 nm de absorvância, durante 3 minutos a 25°C (DE FREITAS; STADNIK, 2015). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.1.5.3 *Ascorbato Peroxidase (APX)*

A atividade enzimática de ascorbato peroxidase foi determinada pela leitura da reação de 10 μL de extrato enzimático e de 190 μL tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo 2 mM de H_2O_2 e 1,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi mensurada a absorvância de 290 nm, durante 3 minutos, a 30 °C (DE FREITAS et al., 2015). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $\epsilon = 2.8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.1.5.4 *Superóxido dismutase (SOD)*

Para a determinação da atividade enzimática de superóxido dismutase foram realizadas duplicatas adicionando em tubos de ensaio com 2 ml tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8) contendo 10 mM de metionina e 80 μM de NBT, 24 μL de amostra e em seguida 24 μL de 1,17 mM de riboflavina. Cada amostra da duplicata foi agitada e incubada, uma em ambiente escuro e outra em ambiente claro (duas lâmpadas

de 15 W) durante 15 minutos, para em seguida, ser realizada a leitura a absorvância de 560 nm (DE FREITAS et al., 2015). A SOD foi calculada com base em uma curva padrão crescente de unidade de SOD fornecida comercialmente.

2.1.5.5 Quantificação de proteínas totais

A fim de quantificar o conteúdo de proteínas totais, adicionou-se 7 µL de extrato enzimático e 193 µL de reagente Bradford (Sigma-aldrich) em microplaca. O material foi incubado por 15 minutos e lido a absorvância de 595nm (BRADFORD, 1976). A curva padrão foi determinada pela quantidade de proteína em diluições sequenciais da proteína da albumina de soro bovina (BSA), conforme fabricante.

2.1.6 Quantificação de compostos bioquímicos

As amostras foram processadas e os estratos foram obtidos conforme o item acima (2.1.5), exceto pela utilização de tampão de extração, o qual neste item foi utilizado o ácido tricloroacético (TCA 0,1%) na proporção 1:5 (p/v) (DE QUADROS et al., 2019). Os extratos obtidos foram armazenados em gelo para posterior leitura.

2.1.6.1 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada adicionando 75 µL de fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0) e 150 µL de 1 M de iodeto de potássio em 75 µL de extrato. A reação foi incubada durante 15 minutos e lida a 390 nm de absorvância (DE QUADROS et al., 2019). A curva padrão foi determinada pela quantidade de H₂O₂ em diluições sequenciais e expressa em µmol.g⁻¹ de peso fresco de folha (PF).

2.1.6.2 Quantificação de malonaldeído (MDA)

A peroxidação lipídica foi mensurada em termos de quantidade de malonaldeído (MDA) em mmol/g de peso fresco da folha. Dessa maneira, foi adicionado em tubo de ensaio 250 µL de extrato e 1 ml de reagente contendo 20% ácido tricloroacético e 0,5% de ácido tiobarbitúrico, os tubos foram incubados a 95 °C a 30 minutos. Após tal período, as amostras foram resfriadas rapidamente em gelo, realocadas em microtubo e

centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. A leitura foi realizada a absorvância de 532 e 600 nm (EL-KOMY, 2014). O cálculo foi realizado pela subtração da leitura de 532 nm por 600 nm, dividido pelo coeficiente de extinção molar utilizado de $\epsilon = 155\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.1.7 Determinação das células hipersensitivas

A determinação de células hipertensivas foi conduzida conforme De Freitas e Stadnik (2012). Para isso, os discos foliares foram acondicionados em placas de petri (5 cm de diâmetro) contendo papel filtro e 5 ml de uma solução de 1 mg/ml de diaminobenzidina (DAB, Sigma-aldrich, EUA), onde permaneceram por 12h, para a formação de polímeros de DAB na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase. Em seguida, com objetivo de clareamento da amostra, a solução de DAB foi substituída por solução de clareamento contendo ácido tricloroacético (0,15%, p/v em álcool etílico: clorofórmio, 4:1, v/v), por 24 h. Por fim, os discos foram transferidos para uma solução de conservação (ácido láctico: glicerol: água, 1:1:1, v/v/v) para análise em microscópio óptico (modelo FWL1500T, Feldmann Wild Leitz, Brasil).

Para a contagem de células hipersensitivas, foi contabilizado apenas o número de células marcadas em coloração vermelha (DAB) em todo o disco foliar, resultando em células hipersensitivas/cm², em cada amostra.

2.1.8 Frequência de *C. lindemuthianum* recuperado de tecidos foliares de feijoeiros

Para recuperação de *Cl* de tecidos foliares de feijoeiros, buscou-se o isolamento do fitopatógeno a partir de tecidos com lesões e microlesões típicas de antracnose e assintomáticos de feijoeiros de UFSC-01 e cv. Uirapuru inoculados. Para isso, o tecido, de aproximadamente de 0,04 mm², foi retirado com auxílio de um bisturi. Esse material vegetal foi então, em câmara de fluxo laminar, imergido em álcool 70% por 1 minuto, retirado e imergido em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) por 1 minuto e em depois lavado em água destilada esterilizada (ALFENAS; MAFIA, 2016). Em seguida o tecido foi realocado para placa de petri contendo meio ágar água (20 g/L) e incubado por 10 dias em sala de crescimento (23 ± 1 °C e 12 h de fotoperíodo). O tecido que houve recuperação de *Cl* do seu interior foi contabilizado como tecido com *Cl* recuperado. Repicagens deste crescimento de fungo para placas de petri contendo meio BDA (38 g/L) e laminas para

observação das estruturas do *Cl* foram realizados para confirmação biológica da presença de *C. lindemuthianum*.

2.1.9 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi conduzido completamente casualizado, com três fatores: genótipo (resistente e suscetível), inoculação (inoculadas e não inoculadas) e tempo (0, 12, 24, 48 horas após a inoculação), contendo três repetições de cada tratamento.

A unidade experimental (ue) foi composta por um vaso com três plantas. Para atividade enzimática e compostos bioquímicos, o valor foi obtido pela média de cada folíolo, de cada planta por ue. Referente a nota da escala de severidade, o valor final de cada u.e foi composto pela média da nota de cada planta por ue. Para a determinação de células hipersensitivas, a ue foi composta pela média de dois discos por folíolo central, de cada planta por ue. Para verificação da frequência relativa da recuperação de *Cl* do tecido com sintomas e sadio, a ue foi constituída de 10 tecidos em uma placa de petri, a frequência relativa foi calculada pelo número de tecidos com recuperação de *Cl* pelo número total de tecidos.

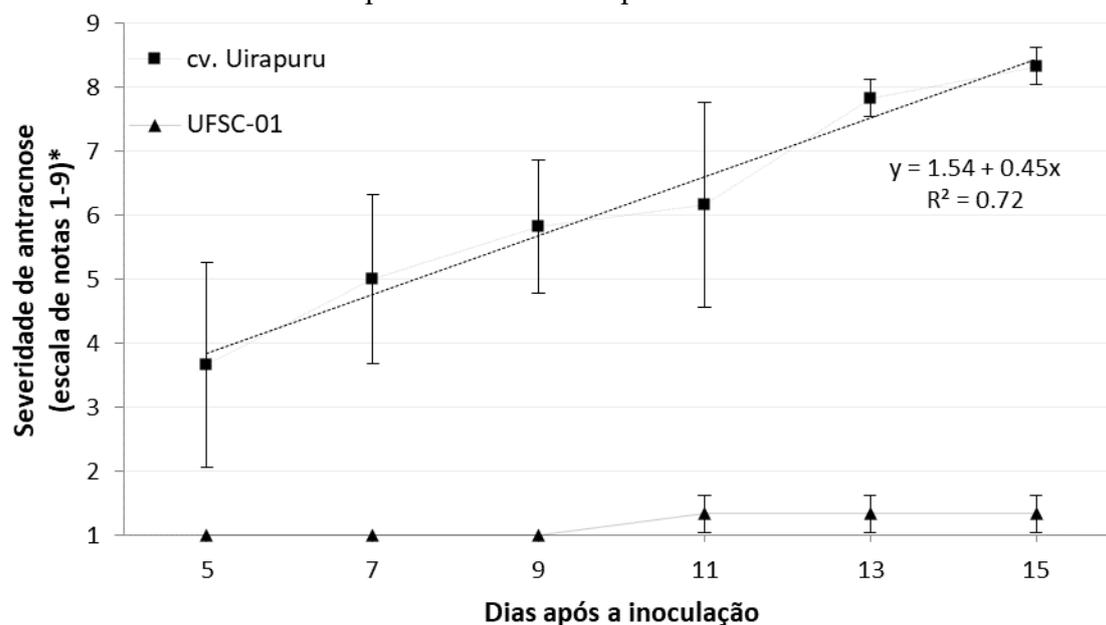
Para análise de variância dos dados, primeiramente foi testado sua homogeneidade e normalidade dos dados, para posteriormente ser realizada tal análise. Os testes de separação de médias utilizados foram teste T-student e teste de Tukey (a 5% e 1% de significância). A correlação foi calculada conforme correlação de Pearson (VIEIRA, 2011), sendo considerada a correlação pequena (0 - 0,25), fraca (0,26 – 0,50), moderada (0,51 – 0,75) e forte (0,76 – 1). Os dados foram analisados com o auxílio do programa R Statistic Studio (3.6.1), utilizando-se os pacotes “ExpeDes” e “Agricolae”.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Severidade da antracnose

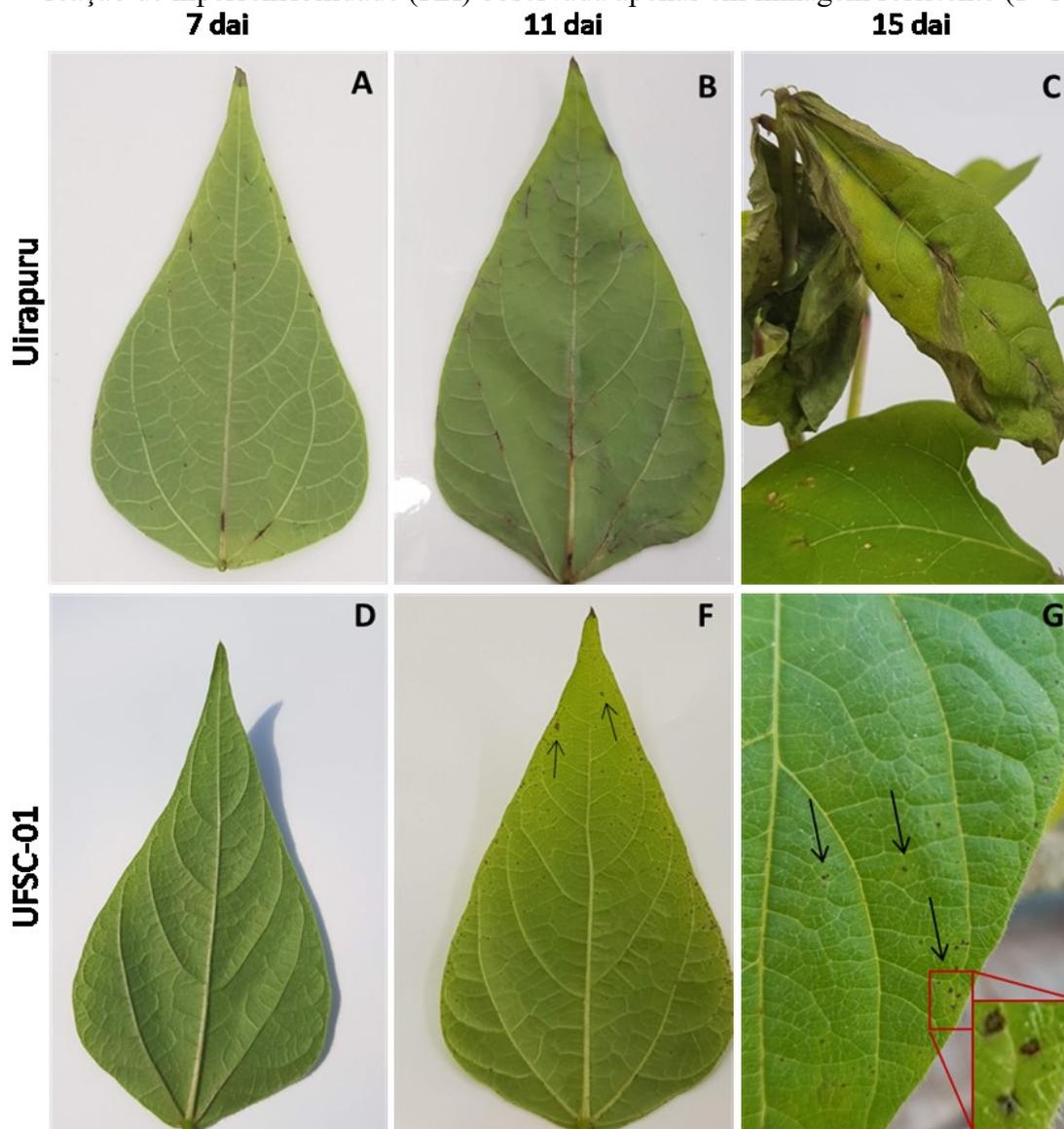
A cv. Uirapuru manifestou severidade superior à UFSC-01 ao longo dos dias após a inoculação (dai) (Figura 3). Os sintomas na cv. Uirapuru iniciaram aos 5 dai, ocorrendo até 3% de manchas necróticas na nervura da face inferior da folha (nota 3 - Tabela 5). Em seguida, a severidade aumentou de forma progressiva e linear até os 15 dai, quando observou-se manchas necróticas em quase todas as nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento, redução do crescimento da planta e lesões abundantes (Figura 4 - C). Por outro lado, os sintomas na linhagem UFSC-01 iniciaram aos 11 dai, com até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas (nota 2 - Figura 3) (F - Figura 4). Estes sintomas foram constantes até os 15 dai.

Figura 3 – Progresso da antracnose em feijoeiro cv. Uirapuru e UFSC-01 inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), dos 5 aos 15 dias após a inoculação. Linhas pontilhadas representam a regressão linear dos sintomas de Cl ao longo do tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.



*Notas da severidade de antracnose conforme escala de Rava et al (1993).

Figura 4 - Sintomas de antracnose na parte abaxial (A-B e D-F) e adaxial (C e G) de folhas de feijoeiro cv. Uirapuru (A-C) e UFSC-01 (D-G), aos 7 (A, D), 11 (B, F) e 15 (C, G) dias após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum*. Setas indicam reação de hipersensibilidade (RH) observada apenas em linhagem resistente (F-G).



2.2.2 Atividade enzimática

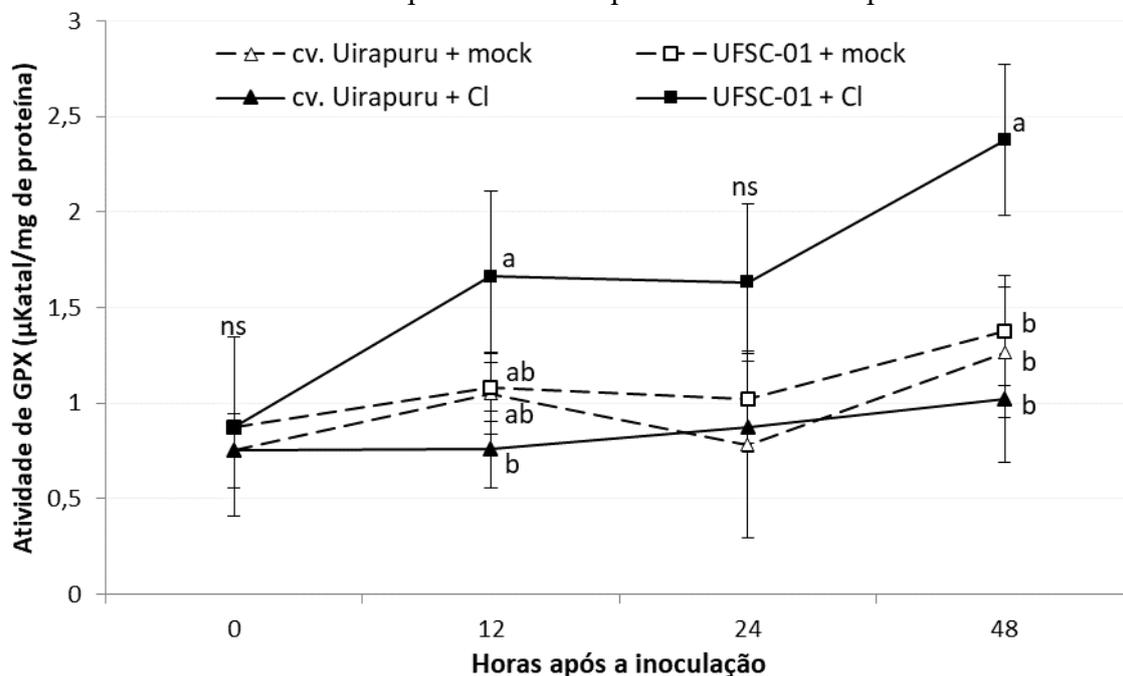
2.2.2.1 Guaiacol peroxidase

A atividade de GPX em UFSC-01 inoculada foi maior que em cv. Uirapuru inoculada às 12 hai e maior que os demais tratamentos às 48 hai (Figura 5). Nesse primeiro período, a atividade foi 55% maior em UFSC-01 inoculada, atingindo 1,66

$\mu\text{Katal/mg}$ de proteína. Às 48 hai, a atividade de GPX em UFSC-01 inoculada foi de 2,38 $\mu\text{Katal/mg}$ de proteína, sendo 43% superior que seu mesmo genótipo não inoculado e 47 e 58% maior que a cv. Uirapuru não inoculado e inoculado, respectivamente. As atividades de GPX foram iguais em genótipos não inoculados e cv. Uirapuru inoculada após a inoculação (Figura 5).

Ao longo do tempo, a atividade de GPX alterou-se somente em UFSC-01 inoculada, incrementando-se de 0,87 a 2,38 $\mu\text{Katal/mg}$ de proteína (Apêndice 1). Em contrapartida, a atividade desta enzima não se modificou em genótipos não inoculadas e cv. Uirapuru inoculada, ao longo dos períodos.

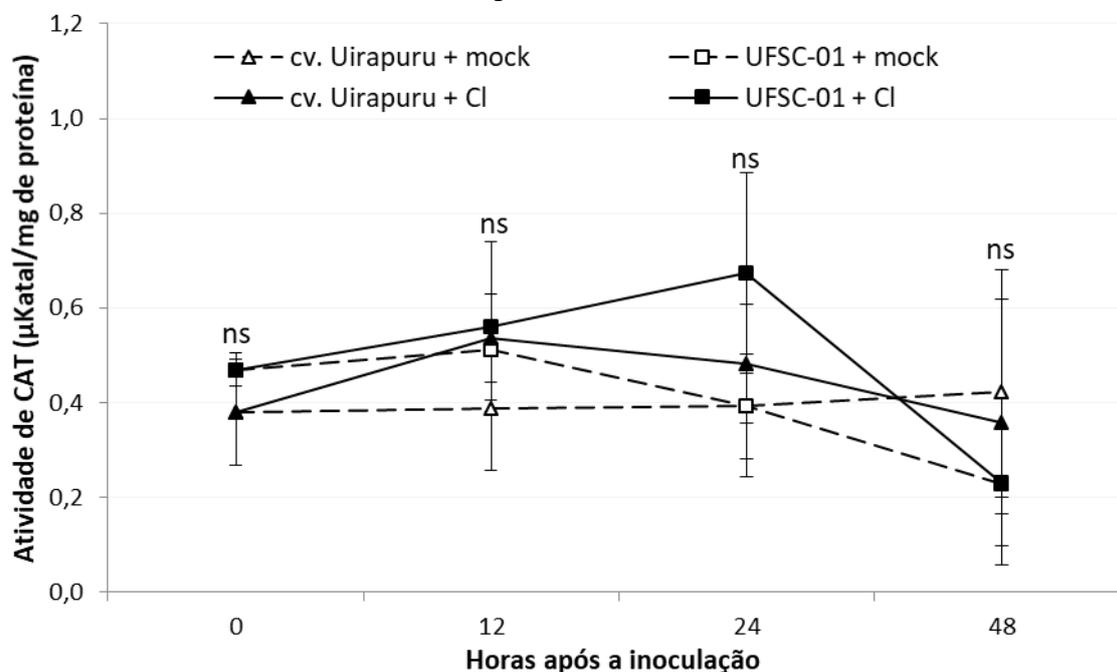
Figura 5 - Atividade de guaiacol peroxidase (GPX) em plantas de feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.



2.2.2.2 Catalase

Genótipos inoculados e não inoculados manifestaram atividade de CAT igual entre si às 0, 12, 24 e 48 hai (Figura 6). A atividade de CAT alterou-se ao longo do período apenas em UFSC-01 inoculadas, a qual permaneceu constante as 0, 12 e 24, e diminuiu apenas às 48 hai, quando atingiu 0,16 $\mu\text{Katal/mg}$ de proteína (Apêndice 1).

Figura 6 - Atividade de catalase (CAT) em plantas de feijoeiro suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.

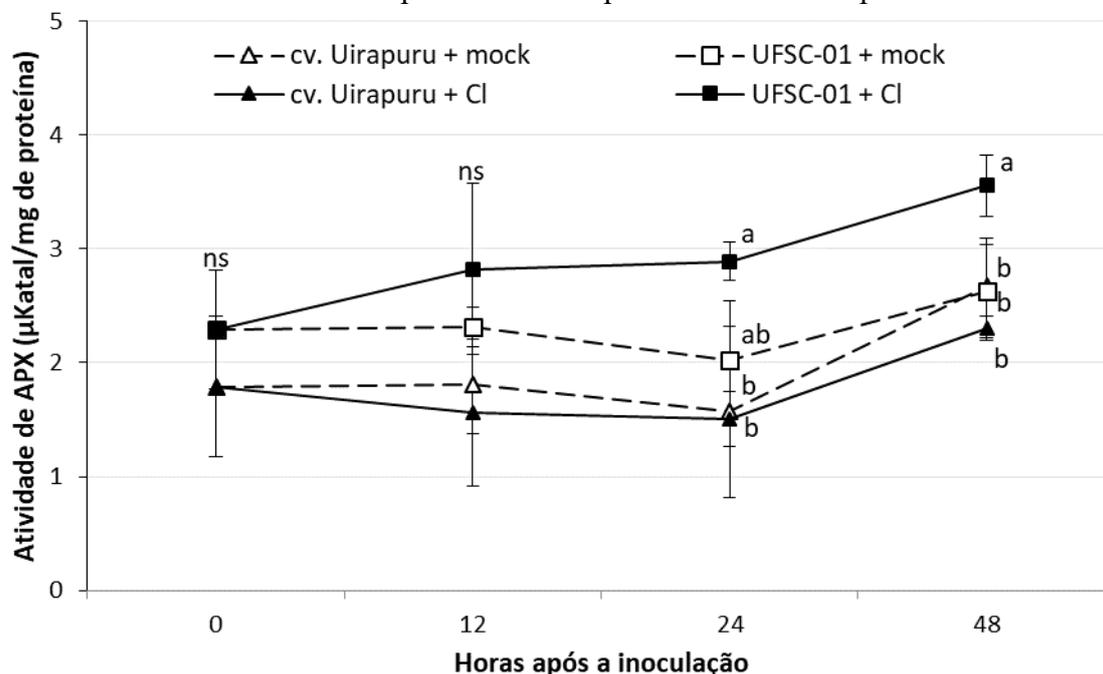


2.2.2.3 Ascorbato peroxidase

Em UFSC-01 inoculada, a atividade de APX foi maior às 24 hai se comparada à cv. Uirapuru, e maior às 48 hai comparando-a aos demais tratamentos (Figura 7). Às 24 hai, a atividade de APX em UFSC-01 foi de 2,88 $\mu\text{Katal/mg de proteína}$, sendo 48 e 45% maior que a cv. Uirapuru inoculada e não inoculada, respectivamente. Por outro lado, no último período, a atividade de APX da UFSC-01 atingiu valor máximo de 3,55 $\mu\text{Katal/mg de proteína}$. Seu valor foi 23% superior que a UFSC-01 não inoculada e, 36 e 25% maior que a cv. Uirapuru inoculada e não inoculada, respectivamente. A atividade desta enzima foi igual em genótipos não inoculados e cv. Uirapuru inoculada após a inoculação.

A atividade de APX ao longo das hai foi distinta apenas em UFSC-01 inoculada, diferenciando-se 0 de 48 hai, enquanto que nos demais tratamentos a atividade foi igual (Apêndice 1).

Figura 7 - Atividade de ascorbato peroxidase (APX) em plantas de feijoeiro suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.

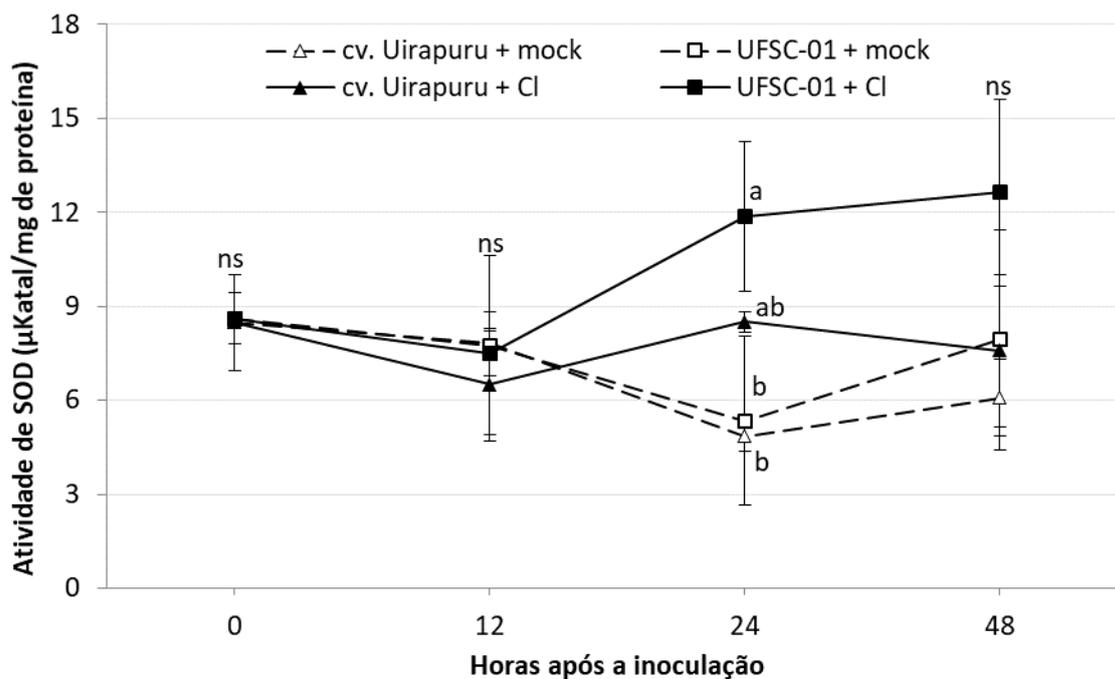


2.2.2.4 Superóxido dismutase

Às 24 hai, a atividade de SOD em UFSC-01 infectada por *Cl* foi de 11,86 μ Katal/mg de proteína, 55% maior que seu mesmo genótipo não infectado e 60% maior que a cv. Uirapuru não infectada (Figura 8). A atividade de SOD dos genótipos não inoculados e cv. Uirapuru inoculada foram iguais entre si às 0, 12 e 48 hai.

A atividade de SOD ao longo do período foi igual não somente em cv. Uirapuru inoculada e não inoculada, mas também em UFSC-01 não inoculada. A atividade desta enzima diferiu-se ao longo dos períodos apenas em UFSC-01 inoculada (Apêndice 1).

Figura 8 - Atividade de superóxido dismutase (SOD) em plantas de feijoeiro suscetível (Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias.



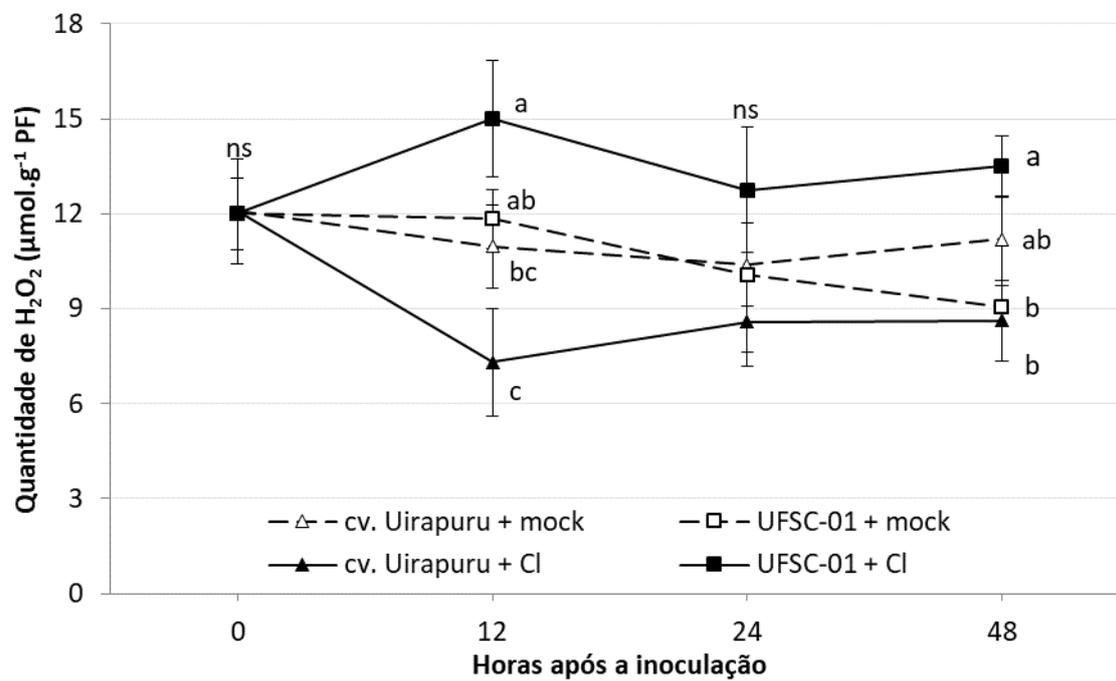
2.2.3 Compostos bioquímicos

2.2.3.1 Peróxido de hidrogênio

A quantidade de H_2O_2 por peso fresco de folha foi maior em UFSC-01 inoculada às 12 hai se comparada a cv. Uirapuru inoculada e não inoculada, e às 48 hai se comparada a cv. Uirapuru inoculada e ao seu mesmo genótipo não inoculado (Figura 9). Neste primeiro período, a quantidade de H_2O_2 foi de $15,01 \mu\text{mol.g}^{-1}$ em UFSC-01 inoculada, quantidade 52 e 27% superior que na cv. Uirapuru inoculada e não inoculada, respectivamente. Às 48 hai, essa quantidade foi de $13,69 \mu\text{mol.g}^{-1}$ em UFSC-01 inoculada, sendo 33% maior que seu mesmo genótipo não inoculado e 36% maior que a cv. Uirapuru inoculada. Em genótipos não inoculados, a quantidade de H_2O_2 por peso fresco de folha foi igual após a inoculação. A quantidade de peróxido de hidrogênio em cv. Uirapuru foi menor que os feijoeiros UFSC-01 às 12 hai e menor que UFSC-01 inoculada às 48 hai.

Ao longo dos períodos, a quantidade de H_2O_2 foi constante em todos os genótipos, inoculados e não inoculados (Apêndice 2).

Figura 9 – Quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ^{ns} não significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. PF: Peso fresco de folhas.

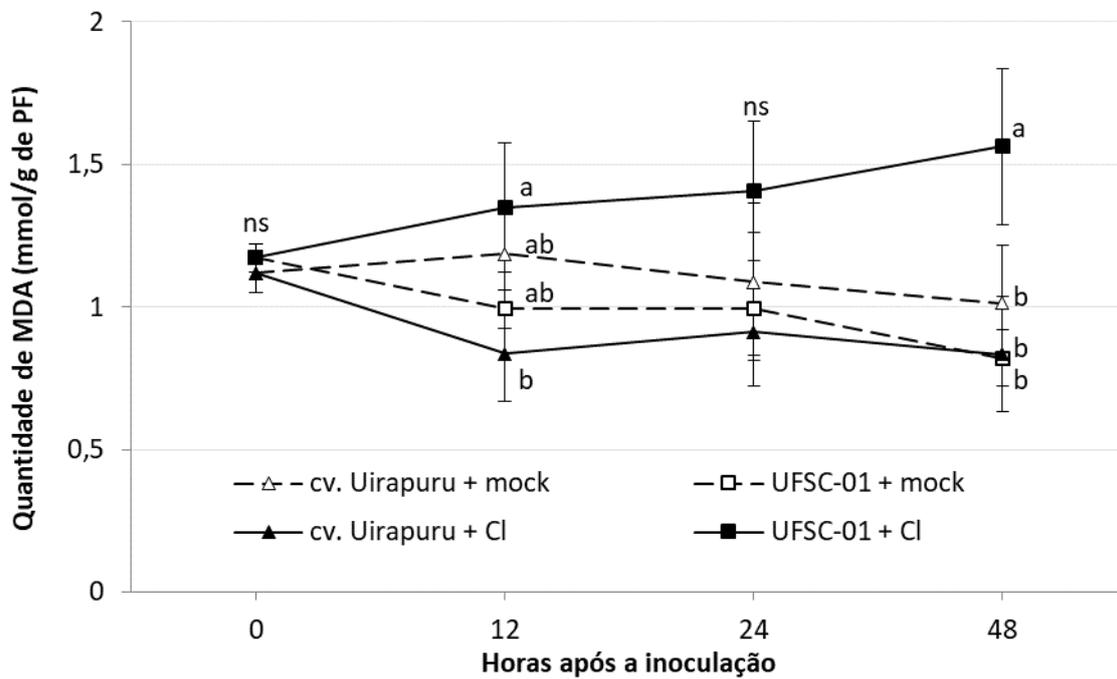


2.2.3.2 Malonaldeído

A quantidade de MDA em UFSC-01 inoculada foi maior que em cv. Uirapuru inoculada às 12 hai e maior que os demais tratamentos às 48 hai (Figura 10). Às 12 hai, a quantidade de MDA em UFSC-01 foi de 1,34 mmol/g de peso fresco na folha, quantia 27% maior que na cv. Uirapuru. O acúmulo de MDA às 48 hai na UFSC-01 infectada foi 48% superior do que em UFSC-01 não inoculado e cv. Uirapuru inoculada. Enquanto que comparada à cv. Uirapuru não inoculado, o aumento foi de 36%. Por outro lado, a quantidade de MDA em genótipos não inoculados e cv. Uirapuru infectada foram iguais após a inoculação.

Ao longo dos tempos, a quantia de MDA foi diferente em UFSC-01 inoculada e não inoculada, ao passo que em cv. Uirapuru inoculada e não inoculada esta quantia foi igual (Apêndice 2).

Figura 10 - Quantidade total de malonaldeído (MDA) em feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados e não inoculados (mock) com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Letras indicam diferença significativa entre genótipos inoculados e não inoculados no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). ns não significativa entre genótipos, inoculados e não inoculados no mesmo tempo. As barras representam o desvio padrão das médias. PF: Peso fresco de folha.



2.2.4 Células com reação de hipersensibilidade

O número de células hipersensitivas da superfície foliar da UFSC-01 aumentou progressivamente e foi maior após 12 hai, se comparado à cv. Uirapuru e a plantas controle (Figura 11). Houve também aumento progressivo em cv. Uirapuru, no entanto menor do que em UFSC-01 e superior a plantas controle, após 12 hai. O aumento progressivo das células hipersensitivas na UFSC-01 foi maior que em cv. Uirapuru (inclinação da regressão – Figura 11).

Ao longo do tempo, o número de células hipersensitivas foi diferente em UFSC-01, enquanto que em cv. Uirapuru esse número não se alterou de 0 até 12 hai e diferenciou-se apenas de 24 até 48 hai (Apêndice 3). Por outro lado, os números destas estruturas foram iguais em plantas controle ao longo das hai. As células hipersensitivas podem ser visualizadas na Figura 12, assim como as estruturas de infecção do *Cl*.

Figura 11 - Células hipersensíveis por cm^2 na superfície foliar de feijoeiro suscetível (cv. Uirapuru), resistente (UFSC-01) e controle (não inoculados), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl). O controle representa plantas cv. Uirapuru e UFSC-01 não inoculadas. Linhas pontilhadas representam a regressão linear das médias dos genótipos ao longo do tempo. * indica diferença significativa entre as médias da inclinação da reta dos genótipos (teste de t-sudent, $P \leq 0.05$). Letras indicam diferença significativa entre genótipos no mesmo tempo (teste Tukey, $P \leq 0,05$). As barras indicam o desvio padrão da média.

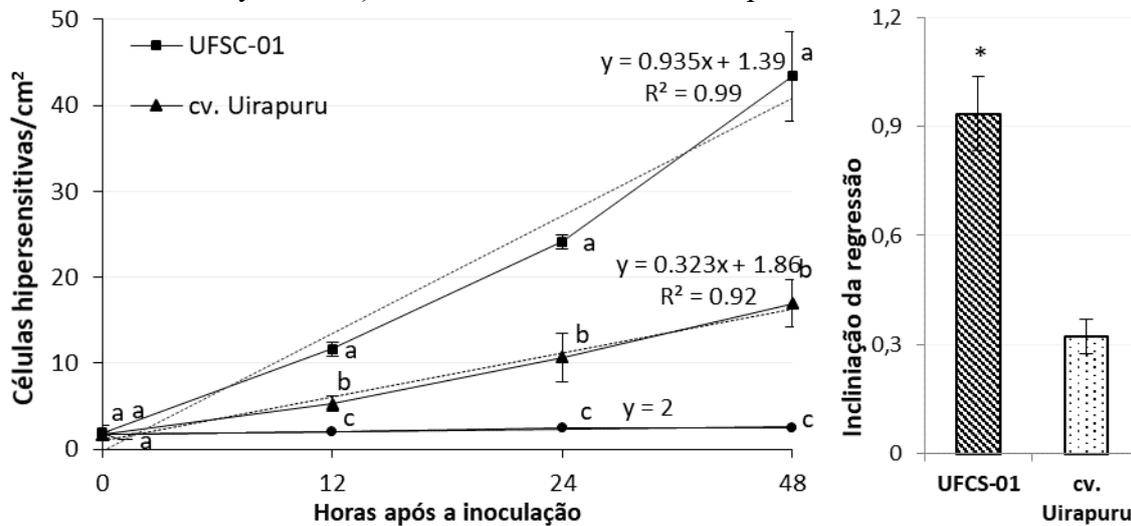
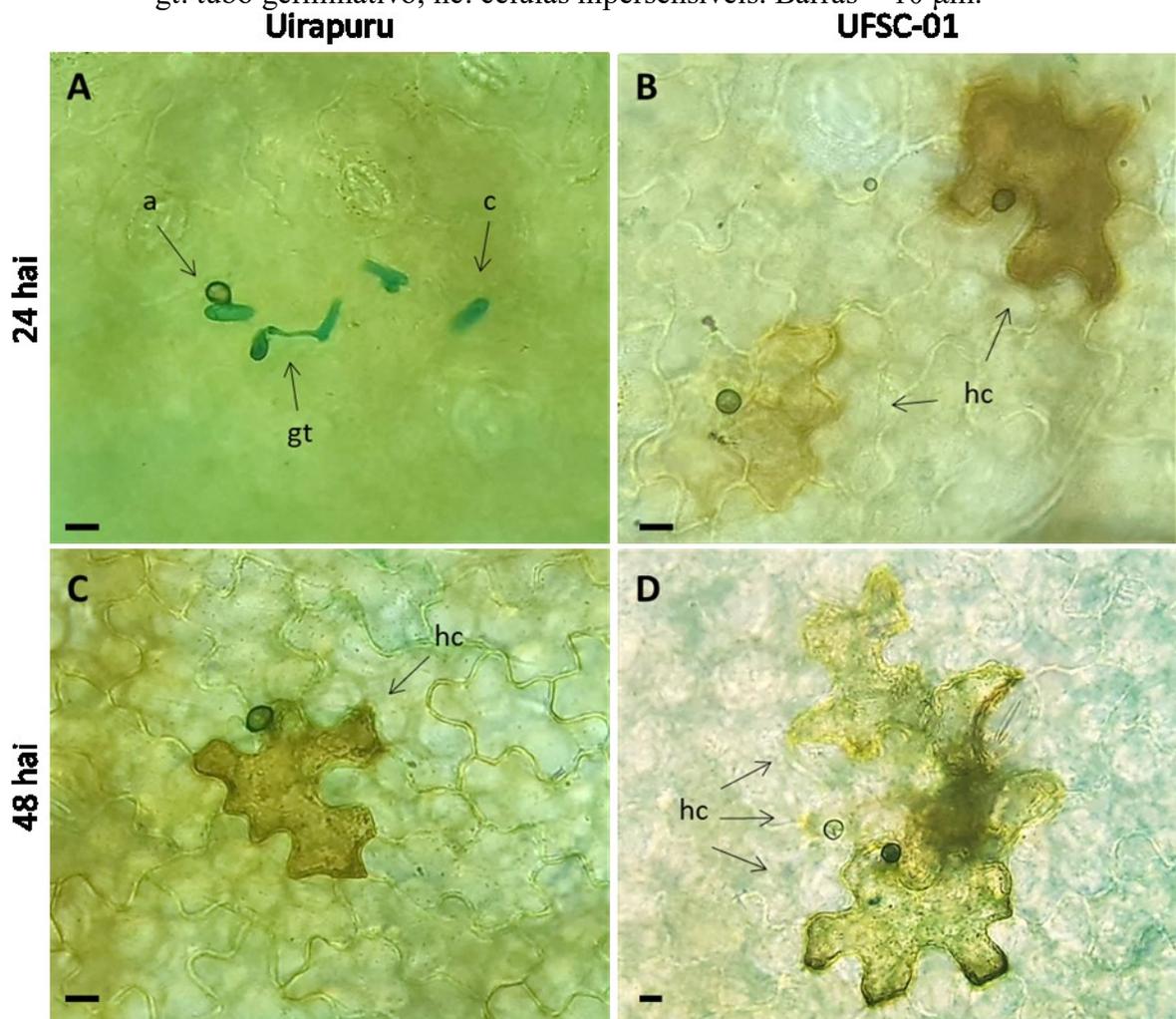


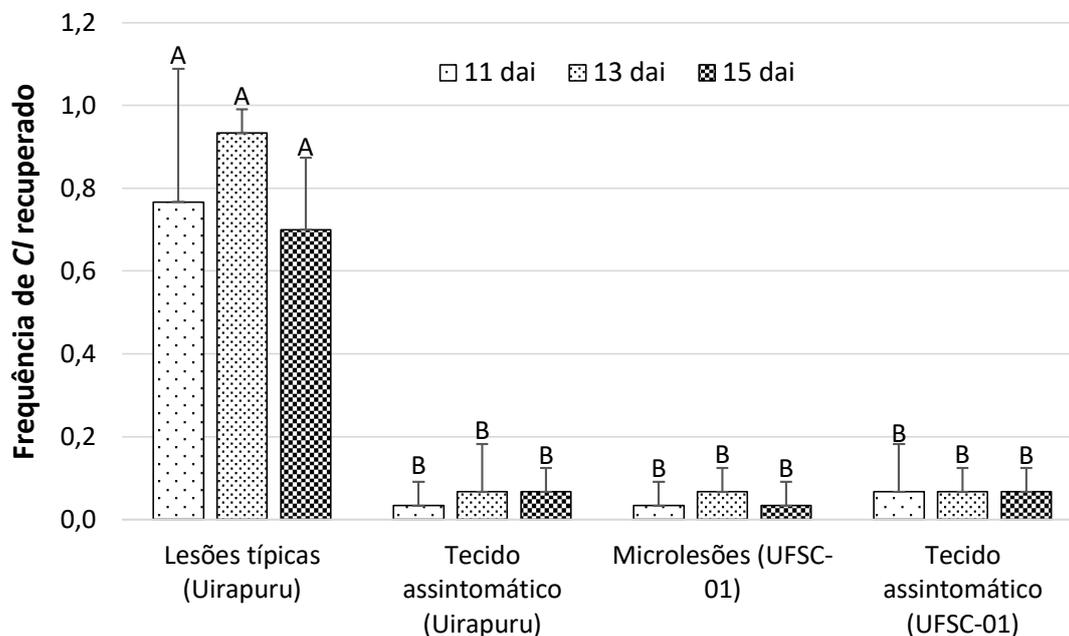
Figura 12 - Estrutura da infecção do *Colletotrichum lindemuthianum* (*Cl*) e células hipersensitivas em cv. Uirapuru suscetível (A, C) e linhagem UFSC-01 resistente (B, D) s 24 (A, B) e 48 (C, D) horas após a inoculação (hai) com *Cl*. c: conídio; a: apressório; gt: tubo germinativo; hc: células hipersensíveis. Barras = 10 µm.



2.2.5 Frequência de *C. lindemuthianum* recuperado de tecidos foliares de feijeiros

A frequência relativa de *Cl* recuperado foi maior em tecido com lesões típicas de antracnose de cv. Uirapuru do que em tecidos assintomáticos de mesmo genótipo, bem como em tecido com microlesões e assintomático de UFSC-01 (Figura 13). A frequência relativa de *Cl* recuperado em material vegetal com lesões em cv. Uirapuru foi de 77% aos 11 dai, alcançou 93% em 13 dai e incidiu 70% aos 15 dai. Por outro lado, em tecidos assintomático de ambos os genótipos e UFSC-01 com microlesões, a frequência relativa de *Cl* recuperado foi de 3% a 7% ao longo dos dias. Houve incidência de *C. lindemuthianum* em tecidos foliares sintomáticos e assintomáticos de ambos os genótipos.

Figura 13 – Frequência de *Colletotrichum lindemuthianum* (*Cl*) recuperado de tecidos foliares com lesões (cv. Uirapuru) e microlesões (UFSC-01) típicas de antracnose e de tecidos assintomáticos de feijoeiros inoculados. dai: dias após a inoculação. Os dados foram transformados pela raiz quadrada para aplicação de análises estatísticas. Letras indicam diferença significativa entre as médias (teste de Tukey, $P \leq 0,05$)



Os dados da frequência de *Cl* recuperado (Figura 12) foram transformados pela raiz quadrada de cada dado ($\sqrt{x+0,1}$), para aplicação dos teste de Tukey e se encontram no Apêndice 4.

2.2.6 Correlação entre variáveis respostas

As correlações entre as variáveis respostas foram positivas na maioria das comparações entre GPX, APX, SOD, H_2O_2 , MDA e RH. Por outro lado, há um predomínio de correlações negativas entre a CAT, SEV (severidade) e ISO (isolamento/recuperação de *Cl*) se comparado às demais variáveis. A correlação considerada positiva e forte foi apenas entre SEV – ISO (0,91), tendo um predomínio de correlações moderadas (10), seguidas por pequena (9), fracas (8) e forte (7).

Tabela 6 – Correlação de Pearson entre dados de guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), células com reação de hipersensibilidade (RH), severidade de antracnose (SEV) e, *Cl* isolado (ISO). * indica diferença significativa entre as correlações (teste de t-sudent, P≤0.05) e ** indica diferença significativa (teste de t-sudent, P≤0.01).

	GPX	CAT	APX	SOD	H ₂ O ₂	MDA	RH	SEV	ISO
GPX	-	-0,21	0,50**	0,42*	0,41**	0,51**	0,68**	-0,54**	-0,69
CAT	-0,21	-	-0,18	0,09	0,05	-0,04	-0,17	-0,18	0,10
APX	0,50**	0,18**	-	0,42**	0,23*	0,27	0,55**	-0,51*	-0,87*
SOD	0,42**	0,09	0,42**	-	0,30*	0,40**	0,57**	-0,51*	-0,82*
H ₂ O ₂	0,41**	0,05	0,23*	0,30*	-	0,69	0,25	-0,80	-0,93
MDA	0,51**	-0,04	0,27	0,40**	0,69	-	0,50**	-0,72	-0,87*
RH	0,68**	-0,67	0,55**	0,57**	0,25	0,50**	-	-0,29	-0,88
SEV	-0,52**	-0,18	-0,51*	-0,51*	-0,80	-0,72	-0,29	-	0,91**
ISO	-0,69	0,10	-0,87*	-0,82*	-0,93	-0,87*	-0,88	0,91**	-

2.3 DISCUSSÃO

A antracnose é uma doença muito agressiva ao feijoeiro, caso a cultivar utilizada na lavoura seja suscetível, os danos à produção podem chegar até 100% (PASTOR-CORRALES; TU, 1989; MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017). O uso de cultivares resistentes pode ser uma alternativa para evitar estas perdas. Após a inoculação com *Cl*, a cv. Uirapuru manifestou severidade de antracnose sempre superior à linhagem UFSC-01 (Figura 3). Aos 11 dai, a UFSC-01 manifestou os primeiros sintomas, com 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas (Tabela 5). Enquanto que a cv. Uirapuru manifestou sintomas iniciais aos 5 dai, com 3% de manchas necróticas nas nervuras da face inferior da folha. Esse atraso na manifestação de sintomas na UFSC-01 aponta alguma reação do feijoeiro para impedir o progresso da antracnose, impedimento este não observado na cv. Uirapuru. Até os 15 dai, a UFSC-01 expressou sintomas constantes, enquanto que a cv. Uirapuru manifestou alta severidade, como manchas necróticas em quase todas as nervuras, desfolhamento, redução do crescimento da planta e lesões abundantes. Em pesquisas feitas para busca de genótipos resistentes, a nota de 1 a 3 é atribuída a genótipos resistentes, ao passo que a nota 4 ou superior é concedida a genótipos suscetíveis (ALZATE-MARIN et al., 2007; DAVIDE; SOUZA, 2009). As quantidades de sintomas nos genótipos ao longo do período indicam que a cv. Uirapuru é suscetível, enquanto que a UFSC-01 é resistente. As severidades aos 15 dai também indicam que, de algum modo, a UFSC-01 conteve o *Cl* ao longo do período, evento não observado na cv. suscetível Uirapuru. De Freitas e Stadnik (2012) observaram resultados semelhantes, a mesma cultivar trabalhada apresentou severidade de 60% de área da folha necrosada, enquanto que a UFSC-01 apresentou poucos sintomas. Em pesquisa similar, Davide e Souza (2009) inocularam cultivares resistentes e suscetíveis, logo, em seus experimentos, feijoeiros resistentes apresentaram notas de 1 a 2 e feijoeiros suscetíveis notas de 6 a 9, corroborando com o presente estudo. Os autores associaram a resistência e suscetibilidade aos genes de resistência *Co*- presentes no feijoeiro, ressaltando efetividade e a ação da resistência genética do feijoeiro contra raças de *Cl*.

Durante os estágios iniciais de infecção do *Cl*, inicia-se um série de etapas de reconhecimento e ativação dos mecanismos de defesa do feijoeiro para impedir a cololização deste fitopatógeno (BORGES et al., 2012). Existem diversos mecanismos de resistência associado à defesa da planta, um deles que se destaca é a alteração do

metabolismo oxidativo, resultando em explosão oxidativa capaz de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), como o H_2O_2 e o O_2^- (O'BRIEN et al., 2012; SHARMA et al., 2012). Oriundo do metabolismo oxidativo, as EROs podem ser produzidas por enzimas e possuir diversas funções nas células, como ação antifúngica, sinalizadora e tóxica á celula do próprio hospedeiro (BREUSEGEM; DAT, 2006; SHETTY et al., 2008). Diante do exposto a alteração de enzimas produtoras e desintoxicadoras de EROs, assim como os produtos resultantes deste metabolismo, podem determinar ou não a defesa da planta contra o patógeno (SHETTY et al., 2008; SHARMA et al., 2012; BALINT-KURTI, 2019).

Nos diferentes períodos de infecção, houve aumento na atividade de GPX na UFSC-01 às 12 e 48 hai, quando comparada ao genótipo suscetível e aos demais genótipos, respectivamente (Figura 5). Em outras pesquisas, experimentos apontam a GPX estar associada ao metabolismo oxidativo, explosão oxidativa e produção de peróxido de hidrogênio em células de feijoeiros desafiados com *Cl* (WOJTASZEK; TRETOWAN; BOLWELL, 1997; BLEE et al., 2001; BOLWELL et al., 2002). Ao mesmo passo, esse aumento de atividade de GPX em UFSC-01 pode ter aumentado a produção de H_2O_2 , corroborando com o incremento da quantidade de peróxido de hidrogênio na UFSC-01 nos mesmos períodos (Figura 9). Contudo, a mesma ação da GPX não foi observada em cv. suscetível e genótipo resistente não inoculado, os quais mantiveram suas atividades de GPX e quantidades de H_2O_2 constantes. A alta atividade de GPX em plantas pode acarretar em aumento significativo de peróxido de hidrogênio, que influencia todo o metabolismo oxidativo e sua consequência sob hospedeiro e patógeno (SHETTY et al., 2008; CAMEJO; GUZMÁN-CEDEÑO; MORENO, 2016). Ao longo dos períodos, a atividade de GPX alterou-se apenas em genótipo resistente (Apêndice 1), idicando que a alteração e o aumento desta atividade de enzima após a infecção é crucial para a defesa do feijoeiro á antracnose. Em mesmo patossistema, De Freitas e Stadnik (2012) encontraram atividade de GPX semelhante a do presente trabalho, demonstrando também a importância desta enzima para a defesa da planta. Em contrapartida, a enzima GPX pode estar envolvida em outros mecanismos de defesa, como na utilização de H_2O_2 para lignificação da parede celular ou até na atividade antifúngica (ALMAGRO et al., 2009; SHARMA et al., 2012; MIEDES et al., 2014). Resultado similar foi encontrado em pesquisa na defesa de feijão-de-corda contra *Colletotrichum*, onde genótipo resistente obteve maior atividade de GPX às 12 e 24 hai, se comparado ao genótipo suscetível (OLIVEIRA et al., 2014). Logo, na defesa do

feijoeiro a *Cl*, a atividade de GPX está associada à produção de H_2O_2 , tendo papel fundamental no metabolismo oxidativo. Outras pesquisas poderiam ser feitas para observar a atividade de GPX em momentos posteriores ou verificar a possibilidade da atividade desta enzima estar ligada a outro mecanismo de defesa do feijoeiro. Exemplos são estudos voltados a lignificação e metabolismo da rota dos fenilpropanóide, visto que a GPX também pode atuar na lignificação da parede celular do hospedeiro.

A atividade de CAT foi semelhante nos diferentes períodos em feijoeiro resistente e suscetível, inoculados ou não, podendo indicar que a atividade desta enzima não difere entre os genótipos, até 48 hai (Figura 6). Isso indica que a CAT não está envolvida na resistência do feijoeiro a antracnose nos primeiros períodos de infecção, não havendo a sua participação na desintoxicação de EROs em feijoeiros inoculados até 48 hai. Na defesa do feijoeiro contra *Sclerotinia sclerotiorum*, a atividade de CAT não aumentou nas cultivares resistentes e suscetíveis com a infecção do patógeno até 76 hai (LEITE et al., 2014). Situação semelhante foi vista na infecção do *Colletotrichum* em leguminosa *Stylosanthes guianensis*, onde a atividade de CAT permaneceu igual até 48 hai, comparando leguminosa suscetível infectada à leguminosa controle (WANG et al., 2017). Estas informações indicam que a CAT pode ter ação apenas em estágios tardios da infecção, retardando a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Assim, a CAT parece não estar envolvida na defesa do feijoeiro comum a *Cl* até 48 hai, não atuando na desintoxicação de EROs em plantas resistente e suscetíveis. A continuação da determinação da atividade de CAT em períodos posteriores às 48 hai poderia trazer informações interessantes se há desintoxicação de EROs nos genótipos durante o final da fase biotrófica e início da necrotrófica do *Cl*.

Importante para o metabolismo oxidativo, a atividade APX foi maior em genótipo resistente às 24 ha, se comparado a genótipo suscetível, e maior às 48 hai se comparado a genótipo suscetível e a mesmo genótipo não inoculado (Figura 7). A APX está associada à desintoxicação de EROs, ao reduzir H_2O_2 em H_2O (SHARMA et al., 2012). Embora a maior atividade de APX possa estar atuando em feijoeiro resistente, pode ser que esta ação enzimática seja insuficiente para desintoxicar a célula de H_2O_2 com eficiência. A quantidade de H_2O_2 diminuiu às 24 e 48 hai em UFSC-01, corroborando com o aumento da atividade de APX neste mesmo tempo. Ao longo do período, a atividade de APX modifica-se apenas em UFSC-01 resistente, ocorrendo um aumento de 0 até 48 hai (Apêndice 1). Isso demonstra que a infecção do fungo altera a atividade desta enzima, contudo, parece não a modificar o suficiente para causar grandes

desintoxicação de EROs. Em experimentos de melão inoculados com *Colletotrichum* (GE; BI; GUEST, 2013) foram observados resultados similares. Nele, a atividade de APX em cv. resistente foi maior às 12 e 24 hai, enquanto que a cv. suscetível foi sempre menor, exceto as 48 hai. Outros trabalhos também demonstraram a atividade de APX igual em cv. suscetíveis e plantas controle de leguminosa (*S. guianensis*) inoculada com *Colletotrichum* (WANG et al., 2017). Portanto, a infecção por *Cl* altera a atividade de APX em genótipo resistente UFSC-01, todavia, não sendo capaz de diminuir a quantidade de peróxido de hidrogênio e eliminar as consequências do alto acúmulo de H_2O_2 , como a RH. Para futuras pesquisas na defesa do feijoeiro comum à antracnose, seria interessante a determinação da atividade da enzima glutathione redutase, para se entender melhor o balanço ascorbato-glutathione e sua interferência no estresse oxidativo.

Responsável pela dismutação de O_2^- em H_2O_2 , a SOD possui papel fundamental na produção desta EROs e no metabolismo oxidativo (MILLER, 2012). Às 24 hai, houve incremento na atividade de SOD na UFSC-01 inoculada, se comparada aos genótipos não inoculados (Figura 8). A alta atividade de SOD na UFSC-01 infectada por *Cl* demonstra uma maior produção de H_2O_2 que em genótipos não inoculados (Figura 9), apontando essa reação em defesa ao fitopatógeno. Por outro lado, a cv. Uirapuru suscetível não aumentou a ação de SOD às 24 hai, se comparado aos genótipos não inoculados, sugerindo a ausência de ação desta enzima durante o processo de infecção do *Cl*. Ao longo dos períodos após a infecção, a atividade de SOD modificou-se apenas na linhagem UFSC-01 resistente (Apêndice 1), evidenciando a necessidade da alteração deste enzima no mecanismo de defesa do feijoeiro à antracnose. Resultados semelhantes também foram encontrados não somente nas respostas de defesa em patossistema feijão-de-corda - *Colletotrichum* (OLIVEIRA et al., 2014), mas também em patossistema meloeiros - *Colletotrichum* (GE; BI; GUEST, 2013). Em cv. resistente de leguminosa, a atividade de SOD foi superior às 12 e 24 hai após inoculação, corroborando também com a alta de H_2O_2 (OLIVEIRA et al., 2014). Na defesa de meloeiro à *Colletotrichum* foi possível observar, também, maior atividade de SOD em cv. resistente se comparado a genótipos não inoculados (GE; BI; GUEST, 2013). O Autor relacionou com o aumento intenso de H_2O_2 presente em cv. resistente.

A quantidade de H_2O_2 na célula é de suma importância para a defesa da planta contra o patógeno. O balanço da quantidade desse composto pode ser nocivo à célula do hospedeiro e ao patógeno, ou não (SHARMA et al., 2012). Em pequenas quantidades, o peróxido de hidrogênio pode atuar apenas como um sinalizador da presença de

microrganismos indesejáveis, já em grande quantidade, pode tornar-se tóxico a própria célula da planta, causando a reação de hipersensibilidade e restringindo o avanço do patógeno (O'BRIEN et al., 2012). A quantidade de H₂O₂ foi maior em UFSC-01 inoculada às 12 e 48 hai, comparando-a ao genótipo suscetível e ao seu mesmo genótipo não inoculado, respectivamente (Figura 9). Esse comportamento é explicado pelas altas atividades das enzimas produtoras de H₂O₂ em genótipo resistente, como a SOD (Figura 8) e GPX (Figura 5). O aumento do acúmulo de H₂O₂ pode estar relacionada a consequências às células do hospedeiro. Uma delas é a morte celular devido à alta concentração desta molécula tóxica, levando ao aumento do número de células que podem sofrer reação de hipersensibilidade (Figura 11). Na defesa do feijão-de-corda a *Colletotrichum*, a cv. resistente apresentou aumento na quantidade de H₂O₂ 4,7 vezes maior às 12 hai do que seu nível basal às 0 hai. Esse aumento foi compatível à resistência da planta, ao aparecimento de H₂O₂ em células da superfície e à reação de hipersensibilidade demonstrada pela cv. resistente (OLIVEIRA et al., 2014). O mesmo autor ainda encontrou aumento na cv. suscetível, no entanto apenas 1,69 vezes maior que sua concentração basal de H₂O₂. Em diferente perspectiva, a quantidade de peróxido de hidrogênio em genótipo suscetível cv. Uirapuru foi menor que o genótipo resistente às 12 hai e menor que UFSC-01 inoculado às 48 hai. Esse resultado aponta que a quantidade de H₂O₂ em cv. suscetível é incapaz de causar danos oxidativos a um número de células suficiente para ocasionar restrição do progresso do patógeno e a resistência através de mecanismos de defesa.

Produto da peroxidação lipídica, a quantidade de MDA foi maior às 12 e 48 hai em UFSC-01 resistente inoculado, se comparada à cv. Uirapuru inoculada e a ambos os genótipos, respectivamente (Figura 10). Este resultado indica um aumento na morte celular em genótipo resistente devido à peroxidação lipídica. A ocorrência da oxidação de lipídios da membrana celular pode ser induzida decorrente à alta presença de EROs, que fornecem radicais livre para serem capturados e oxidados por esses lipídios (MUR et al., 2008; GARG; MANCHANDA, 2009). Relacionado a esse fenômeno biológico, a alta da quantidade de peróxido de hidrogênio em UFSC-01 às 12 e 48 hai (Figura 9) pode ter aumentado a disponibilidade de EROs para peroxidação de lipídeos da parede celular deste genótipo. Em interação entre feijão-fava – *Botrytis*, leguminosa e fitopatógeno necrotrófico, observa-se maiores níveis de MDA em cv. suscetível se compara a cv. resistente (EL-KOMY, 2014). Contudo, nesta interação o fungo necrotrófico se beneficia das células mortas pela peroxidação lipídica (EL-KOMY, 2014). Na presente pesquisa, o

Cl aparenta estar sendo prejudicado por: estar ainda na fase biotrófica, estimada em 72 horas; e sofrer restrição da colonização devido à morte celular de células já infectadas ou adjacentes às mesmas. Porém, na interação feijoeiro comum - *C. gloeosporioides*, a peroxidação lipídica em cv. suscetível foi maior apenas aos 4 dai, comparando-a a mesma cv. não inoculada (CHAKRABORTY et al., 2019). Isso pode indicar que a peroxidação lipídica pode beneficiar apenas fitopatógenos na fase necrotrófica. A quantidade de MDA ao longo do período altera-se apenas em genótipo resistente (Apêndice 2), inoculado, ou não, indicando que essa alteração não é proveniente à infecção do *Cl*.

O número de células hipersensitivas foi maior em UFSC-01 resistente às 12, 24 e 48 hai, se comparada à cv. Uirapuru e a plantas controle (Figura 11). Além disso, o aumento do número de células que sofreram RH também foi maior em genótipo resistente do que em genótipo suscetível cv. Uirapuru. O incremento de células hipersensitivas na UFSC-01 indicam a maior capacidade do genótipo resistente em restringir a infecção do fitopatógeno ao autodestruir células que contenham *Cl* ou células ao seu redor. A RH pode ser oriunda de distintos mecanismos de defesa, um deles é a intoxicação e morte celular por EROs, mais especificamente o H_2O_2 (BREUSEGEM; DAT, 2006; BALINT-KURTI, 2019). A atual pesquisa apontou maiores níveis de H_2O_2 às 12 e 48 hai (Figura 9) em UFSC-01 resistente, corroborando com o número de células hipersensitivas (Figura 11). Outra reação biológica relacionada a RH é a peroxidação lipídica (BREUSEGEM; DAT, 2006; MUR et al., 2008; BALINT-KURTI, 2019). Fato que corroborou também com os resultados aqui obtidos, onde UFSC-01 resistente manifestou maiores níveis de MDA às 12 e 48 hai (Figura 10). Em diversos trabalhos foram observadas células hipersensitivas na defesa de plantas a patógenos, destacando-se em patossistemas como feijoeiro comum suscetíveis – *Colletotrichum* (CHAKRABORTY et al., 2019), feijão-de-corda - *Colletotrichum* (BARRETO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2014), alfafa – *Colletotrichum* (TORREGROSA et al., 2004), *Stylosanthes guianensis* – *Colletotrichum* (WANG et al., 2017), entre outros. Na interação melão – oídio, foi observado o maior número de células hipersensitivas/mm² em cv. resistente se compara a suscetível (ROMERO et al., 2008). Tal aumento foi observado em todos os períodos, exceto em momentos muito iniciais (0 e 2 hai) onde o número foi igual. Estes resultados se assemelham com a atual pesquisa, que possuiu maior número de células com RH em UFSC-1 resistente até 48 hai, quando o fungo ainda continua na fase biotrófica. Ao comparar sintomas em plantas, somente em UFSC-01 resistente foi observado lesões típicas de RH (Figura 4). Ao longo dos períodos, o número de células hipersensitivas

diferiu-se em UFSC-01 e cv. Uirapuru, sendo constante em plantas controles não inoculadas (Apêndice 3). Todavia, o número de células que sofreram RH foi igual às 0 e 12 hai em cv. Uirapuru suscetível, enquanto em UFSC-01 resistente houve aumento das 0 às 12 hai. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da quantidade de H_2O_2 em UFSC-01 e pela queda em cv. Uirapuru, ambos às 12 hai. Isso demonstra o atraso da cv. suscetível e a rápida resposta da linhagem resistente em restringir o avanço do *Cl* nos primeiros estágios de infecção, podendo ser crucial para determinar a resistência ou suscetibilidade. Logo, sugere-se que células hipersensitivas podem restringir a infecção de *C. lindemuthianum* em feijoeiro comum resistente e são fundamentais nesse mecanismos de defesa (Figura 4). Há uma predominância de correlações moderadas entre as variáveis respostas (Tabela 6) do atual trabalho, apontando ligação moderada entre os resultados obtidos.

Mesmo manifestando poucos sintomas de antracnose, a linhagem UFSC-01 resistente inoculada apresentou a presença de *Cl* em seu tecido, tanto no tecido sintomático, quanto no sadio (Figura 1). O que comprova a eficácia do *Cl* na penetração e infecção de genótipo resistente, contudo, o fitopatógeno não consegue avançar em seu processo de colonização visto que os sintomas não progridem, até 15 dai (Figura 3). Esse evento indica que, após a penetração, o feijoeiro resistente ativa mecanismos de defesa de modo a impedir a colonização do *Cl*. Assim, com a alteração do metabolismo oxidativo e aumento da reação de hipersensibilidade em UFSC-01 resistente, a atual pesquisa aponta o metabolismo oxidativo como mecanismo de defesa do feijoeiro comum à antracnose.

3 CONCLUSÃO

C. lindemuthianum aumentou as atividades das enzimas GPX, APX e SOD, assim como os níveis de H₂O₂ e MDA, mas não CAT, na linhagem resistente UFSC-01, em avaliações feitas até 48 h após a inoculação. Por outro lado, a inoculação não alterou a atividade de GPX, CAT, APX e SOD e a quantidade de MDA na cv. suscetível Uirapuru, na qual essas variáveis bioquímicas não diferiram estatisticamente dos dois genótipos não inoculados. De maneira semelhante, a interação com *Cl* elevou o número de células hipersensitivas em UFSC-01 se comparado à cv. Uirapuru. *Cl* foi recuperado dos tecidos de ambos genótipos, porém com menor frequência a partir das microlesões observadas na linhagem resistente.

A infecção por *Cl* causou modificações nos componentes mencionados do metabolismo oxidativo, as quais foram associadas à resistência do feijoeiro comum à antracnose. A inoculação aumentou também o número de células hipersensitivas em genótipo resistente, restringindo a colonização dos tecidos pelo patógeno. Os resultados demonstram que existe algum mecanismo capaz de impedir a infecção e/ou colonização deste fitopatógeno na linhagem resistente. Dessa maneira, o presente trabalho traz informações importantes para a melhor compreensão de mecanismos bioquímicos que governam a resistência do feijoeiro comum à antracnose.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; KELLY, J. D.; GEPTS, P. Prebreeding in Common Bean and Use of Genetic Diversity from Wild Germplasm. **Crop Science**, v. 47, n. SUPPL. DEC., p. S-44-S-59, dez. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2135/cropsci2007.04.0008IPBS>>.
- AGRIOS, G. Plant Pathology. In: **Plant Pathology: Fifth Edition**. [s.l.] Elsevier, 2005. 9780080473p. 1–922.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Métodos em fitopatologia. p. 516, 2016.
- ALMAGRO, L. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377–390, fev. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ern277>>.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Genetic characterization of anthracnose resistance genes Co-4 3 and Co-9 in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, v. 154, n. 1–2, p. 1–8, 1 mar. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10681-006-9253-x>>.
- ANJUM, N. A. et al. Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 19002–19029, 23 out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7309-6>>.
- ARNOLDI, A. et al. The Role of Grain Legumes in the Prevention of Hypercholesterolemia and Hypertension. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1–3, p. 144–168, 24 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2014.897908>>.
- ASSEFA, T. et al. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 39, n. 2, p. 20, 8 fev. 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11032-018-0920-0>>.
- BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* Races and Gene Pool Diversity in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 123, n. 6, p. 1038–1047, nov. 1998. Disponível em: <<https://journals.ashs.org/view/journals/jashs/123/6/article-p1038.xml>>.
- BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 8, p. mpp.12821, 15 jul. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mpp.12821>>.
- BARRETO, A. L. H. et al. Infection Process and Host Defense Responses in Compatible and Incompatible Interactions between Cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 168, n. 2, p. 193–203, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/509608>>.

- BLEE, K. A. et al. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. **Plant Mol Biol**, v. 47, p. 607–620, 2001.
- BOLWELL, G. P. et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1367–1376, 15 maio 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/2884827/The>>.
- BOLWELL, G. P.; DAUDI, A. Reactive Oxygen Species in Plant–Pathogen Interactions. In: RIO, L. A.; PUPPO, A. (Ed.). *Signaling and Communication in Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 113–133.
- BORGES, A. et al. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 12, p. 1216–1220, ago. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.04.003>>.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214514117300405>>.
- BREUSEGEM, V. F.; DAT, J. F. Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 384–390, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.106.078295>>.
- BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55–128, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/klu/plso/2003/00000252/00000001/05102542>>.
- CAMEJO, D.; GUZMÁN-CEDENO, Á.; MORENO, A. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, n. November 2017, p. 10–23, jun. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942816300602>>.
- ČERNÝ, M. et al. Hydrogen Peroxide: Its Role in Plant Biology and Crosstalk with Signalling Networks. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2812, 18 set. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2812>>.
- CHAKRABORTY, N. et al. Interaction between Bean and *Colletotrichum gloeosporioides*: Understanding Through a Biochemical Approach. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 345, 12 set. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/8/9/345>>.
- COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira. p. 157, 2012.
- COSTA, M. R. et al. Development and characterization of common black bean lines resistant to anthracnose, rust and angular leaf spot in Brazil. **Euphytica**, v. 176, n. 2, p.

149–156, 26 nov. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10681-010-0196-x>>.

DAVIDE, L. M. C.; SOUZA, E. A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Cropp Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 23–30, 30 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/modules/news/article.php?storyid=584>>

DE FREITAS, M. B. et al. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 384–390, nov. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.055>>.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 8–13, abr. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.12.004>>.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Alternaria brassicicola* requires reactive oxygen species derived from NADPH oxidase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 90, p. 49–56, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0885576515000284?via%3Dihub>>.

DE QUADROS, F. M. et al. *Fusarium oxysporum* affects differently the hydrogen peroxide levels and oxidative metabolism in susceptible and resistant bean roots. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 106, n. August 2018, p. 1–6, abr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.001>>.

DE QUEIROZ, C. B. et al. The repertoire of effector candidates in *Colletotrichum lindemuthianum* reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 5, p. 2295–2309, 2019.

DE RON, A. M. et al. History of the common bean crop: its evolution beyond its areas of origin and domestication. **Arbor**, v. 192, n. 779, p. a317, 30 jun. 2016. Disponível em: <<http://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/2121/2787>>.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de feijão**. [s.l: s.n.]

EL-KOMY, M. H. Comparative Analysis of Defense Responses in Chocolate Spot-Resistant and -Susceptible Faba Bean (*Vicia faba*) Cultivars Following Infection by the Necrotrophic Fungus *Botrytis fabae*. **The Plant Pathology Journal**, v. 30, n. 4, p. 355–366, 1 dez. 2014. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1PPBG&py=2014&vnc=v30n4&sp=355>>.

FANG, X. et al. Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletotrichum fragariae*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 13, p. 4074–4090, jul. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.022>>.

- FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 23 jun. 2019.
- FARMER, E. E.; MUELLER, M. J. ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 429–450, 29 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120132>>.
- FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of Genes Conferring Resistance to Anthracnose in Common Bean. In: **Translational Genomics for Crop Breeding**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. Ip. 151–181.
- GARCION, C. et al. Mechanisms of Defence to Pathogens: Biochemistry and Physiology. In: **Induced Resistance for Plant Defense**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. 9781118371p. 106–136.
- GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 143, n. 1, p. 81–96, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11263500802633626>>.
- GE, Y.; BI, Y.; GUEST, D. I. Defence responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 81, n. 2013, p. 13–21, jan. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.09.002>>.
- GEFFROY, V. et al. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: a case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 3, p. 407–415, 4 fev. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00122-007-0678-y>>.
- GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 10375–10394, 30 jul. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4532-5>>.
- GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates using differential cultivars of common bean in Santa Catarina State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 883–888, out. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132008000500002&lng=en&tlng=en>.
- GONZÁLEZ, A. M. et al. Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. MAR, 17 mar. 2015. Disponível em: <http://www.frontiersin.org/Plant_Genetics_and_Genomics/10.3389/fpls.2015.00141/abstract>.
- GRAHAM, P. H.; RANALLI, P. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, v. 53, n. 1–3, p. 131–146, jul. 1997. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378429097001123>>.

IBGE. LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA: In: **pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, 2017**. [s.l: s.n.]p. 81.

IBGE. **IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)**. Disponível em: <<ftp.ibge.gov.br> > Estimativas_2019 > estimativa_dou_2019>. Acesso em: 15 jan. 2020.

KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. A Comprehensive Review of the Major Genes Conditioning Resistance to Anthracnose in Common Bean. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1196–1207, out. 2004. Disponível em: <<https://journals.ashs.org/view/journals/hortsci/39/6/article-p1196.xml>>.

KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I. E. Defense Responses of Plants to Pathogens. In: **Advances in Botanical Research**. [s.l: s.n.]21p. 1–34.

KÜNSTLER, A. et al. Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 93, p. 75–84, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576516300030>>.

LEITE, M. E. et al. Biochemical responses associated with common bean defence against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 138, n. 2, p. 391–404, 8 fev. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10658-013-0341-1>>.

MAHUKU, G. S. et al. Sources of Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the Secondary Gene Pool of *Phaseolus vulgaris* and in Crosses of Primary and Secondary Gene Pools. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1383–1387, dez. 2002. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2002.86.12.1383>>.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and Molecular Diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* Isolates from Andean and Mesoamerican bean Varieties and Regions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n. 3, p. 253–263, mar. 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:EJPP.0000019795.18984.74>>.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 352–356, ago. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138502022975>>.

MEZIADI, C. et al. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, v. 242, p. 351–357, jan. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.006>>.

MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, out. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article->

lookup/doi/10.1093/jxb/erq282>.

MIEDES, E. et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. August, p. 1–13, 5 ago. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00358/abstract>>.

MILLER, A.-F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v. 586, n. 5, p. 585–595, 9 mar. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2011.10.048>>.

MOHAMMED, A. An Overview of Distribution, Biology and the Management of Common Bean Anthracnose. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 04, n. 08, p. 4–9, 2013. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/an-overview-of-distribution-biology-and-the-management-of-common-bean-anthracnose-2157-7471.1000193.php?aid=17349>>.

MONTEMOR, L. et al. Detecção de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes do banco de germoplasma de feijão da Universidade do Estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2012.

MUR, L. A. J. et al. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 3, p. 501–520, fev. 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erm239>>.

O'BRIEN, J. A. et al. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. **Planta**, v. 236, n. 3, p. 765–779, 6 set. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00425-012-1696-9>>.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A. Differences in the extent of fungal development, host cell necrosis and symptom expression during race-cultivar interactions between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 351–362, set. 1988. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02085.x>>.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A. Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*. In: **Electron Microscopy of Plant Pathogens**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. p. 211–222.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75–98, jul. 1985. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004840598590058X>>.

OBLESSUC, P. R. et al. Dissecting *Phaseolus vulgaris* Innate Immune System against *Colletotrichum lindemuthianum* Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43161, 17 ago. 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0043161>>.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. Review the complexity of pathogen defense in plants. **Signal Transduction**, v. 27, n. May, p. 101–109, 2001.

OLIVEIRA, J. et al. Role of Antioxidant Enzymes, Hydrogen Peroxide and PRProteins in the Compatible and Incompatible Interactions of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Genotypes with the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Plant physiology & pathology**, v. 02, n. 03, 2014.

PADDER, B. A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–26, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165823>>.

PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3867>>.

PASTOR-CORRALES, M. .; TU, J. . Anthracnose. **Bean production problems in the tropics . Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO**, v. 2, p. 77–104, 1989. Disponível em: <<https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/81817>>.

PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263–270, 31 dez. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF03356321>>.

PERFECT, S. E. et al. *Colletotrichum* : A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal – Plant Interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 198, n. 27, p. 186–198, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>>.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R.; O’CONNELL, R. J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean anthracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 8, p. 813–819, 2001.

QUAN, L. et al. Hydrogen Peroxide in Plants: a Versatile Molecule of the Reactive Oxygen Species Network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 2–18, jan. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>>. RAVA, C. et al. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. p. 12, 1993. Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CENIDA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&exposon=mfn=006528>>.

RAWLINGS, S. L.; O’CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. The spore coat of the bean anthracnose fungus *Colletotrichum lindemuthianum* is required for adhesion, appressorium development and pathogenicity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 70, n. 4–6, p. 110–119, abr. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576507000689>>.

ROMERO, D. et al. Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon–powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 18, p. 1895–1905, dez. 2008. Disponível em:

- <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161708001259>>.
SHAMS, E.; JAVAN-NIKKHAH, M.; MIRZADI GOHARI, A. Dissecting molecular events and gene expression signatures involved in *Colletotrichum lindemuthianum*-*Phaseolus vulgaris* pathosystem in compatible and incompatible interactions. **European Journal of Plant Pathology**, 2020.
- SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 24 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/archive/2012/217037/>>.
- SHETTY, N. P. et al. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 267–280, 20 jul. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10658-008-9302-5>>.
- SINGH, S. P. Broadening the Genetic Base of Common Bean Cultivars. **Crop Science**, v. 41, n. 6, p. 1659–1675, nov. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2135/cropsci2001.1659>>.
- SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 379–396, jul. 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-8454.1986.tb00832.x>>.
- SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199–2223, nov. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2135/cropsci2009.03.0163>>.
- TORREGROSA, C. et al. Cytological , Genetic , and Molecular Analysis to Characterize Compatible and Incompatible Interactions Between *Medicago truncatula* and *Colletotrichum trifolii*. **Molecular plant-microbe interaction**, v. 17, n. 8, p. 909–920, 2004.
- TORRES, M. A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 414–429, abr. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>>.
- TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 373–378, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.106.079467>>.
- VELHO, A. C. et al. Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves. **Fungal Biology**, v. 120, n. 10, p. 1184–1193, out. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.001>>.
- VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. p. 345, 2011.
- WANG, H. et al. Alterations of growth, antioxidant system and gene expression in *Stylosanthes guianensis* during *Colletotrichum gloeosporioides* infection. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 256–266, set. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.024>>.

WOJTASZEK, P.; TRETOWAN, J.; BOLWELL, G. P. Reconstitution in vitro of the components and conditions required for the oxidative cross-linking of extracellular proteins in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 95–98, 17 mar. 1997. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00166-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00166-X)>.

APÊNDICE A – Análises estatísticas dos dados obtidos em experimentos

Apêndice 1 - Atividade enzimática de guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em feijoeiros suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistentes (UFSC-01), inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl) e não inoculados (mock), às 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas indicam diferença entre linhas (teste de Tukey, $P \leq 0,05$). *** indica diferença significativa no valor de $P \cong 0$, ** $\leq 0,01$ e * $\leq 0,05$ no teste ANOVA.

Enzima	Genótipo	Inoculado	Horas após a inoculação				Pr(>F)
			0	12	24	48	
GPX	Uirapuru	Inoculado	0.75Aa	0.75Ba	0.87Aa	1,02Ba	0.129
		Mock	0.75Aa	1.04ABa	0.78Aa	1,26Ba	0.098
	UFSC-01	Inoculado	0.87Aa	1.66Aab	1.63Aab	2,38Ab	0.002**
		Mock	0.87Aa	1.08ABa	1.02Aa	1,37Ba	0.067
	Pr(>F)	0.341	0.024*	0.631	0.005**		
CAT	cv. Uirapuru	Inoculado	0.38Aa	0.53Aa	0.48Aa	0.35Aa	0.621
		Mock	0.38Aa	0.36Aa	0.39Aa	0.42Aa	0.660
	UFSC-01	Inoculado	0.46Aab	0.49Aab	0.70Aa	0.16Ab	0.797
		Mock	0.46Aa	0.51Aa	0.39Aa	0.30Aa	0.545
	Pr(>F)	0.126	0.195	0.067	0.474		
APX	cv. Uirapuru	Inoculado	1.79Aa	1.56Aa	1.50Ba	2.30Ba	0.086
		Mock	1.79Aa	1.80Aa	1.56Ba	2.67Ba	0.165
	UFSC-01	Inoculado	2.29Ab	2.82Aab	2.88Aab	3.55Aa	0.006**
		Mock	2.29Aa	2.31Aa	2.02ABa	2.63Ba	0.387
	Pr(>F)	0.097	0.081	0.027*	0.008**		
SOD	cv. Uirapuru	Inoculado	8.48Aa	6.50Aa	8.49ABa	7.58Aa	0.086
		Mock	8.48Aa	7.80Aa	4.85Ba	6.08Aa	0.050
	UFSC-01	Inoculado	8,60Aa	7.49Aa	11.86Aa	12.63Aa	0.016*
		Mock	8.60Aa	7.75Aa	5.34Ba	7.93Aa	0.724
	Pr(>F)	0.217	0.796	0.005**	0.072		

Valor em μ Katal/mg por proteína.

Apêndice 2 - Quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malonaldeído (MDA) em feijoeiros suscetíveis (cv. Uirapuru) e resistente (UFSC-01), inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl) e não inoculados (mock), às 0, 12, 24 e 48 horas após inoculação. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas indicam diferença entre linhas (teste de Tukey, P≤0,05). *** indica diferença significativa entre o valor de P ≅ 0, ** ≤ 0,01 e * ≤ 0,05 no teste ANOVA.

	Genótipo	Inoculado	Horas após a inoculação				Pr(>F)
			0	12	24	48	
H ₂ O ₂	cv. Uirapuru	Inoculado	12.07Aa	7.30Ca	8.58Aa	8.62Ba	0.203
		Mock	12.07Aa	10.97BCa	10.38Aa	11.20ABa	0.529
	UFSC-01	Inoculado	11.99Aa	15.01Aa	12.76Aa	13.49Aa	0.687
		Mock	11.99Aa	11.84ABa	10.07Aa	9.07Ba	0.063
	Pr(>F)		0.191	0.001**	0.121	0.002**	
MDA	cv. Uirapuru	Inoculado	1.11Aa	0.83Ba	0.91Aa	0.83Ba	0.104
		Mock	1,11Aa	1.18ABa	1.08Aa	1.01Ba	0.363
	UFSC-01	Inoculado	1.17Aa	1.34Aa	1.47Aa	1.56Aa	0.034*
		Mock	1.17Aa	0.99ABab	0.99Aab	0.81Bb	0.015*
	Pr(>F)		0.145	0.028*	0.122	0.006**	

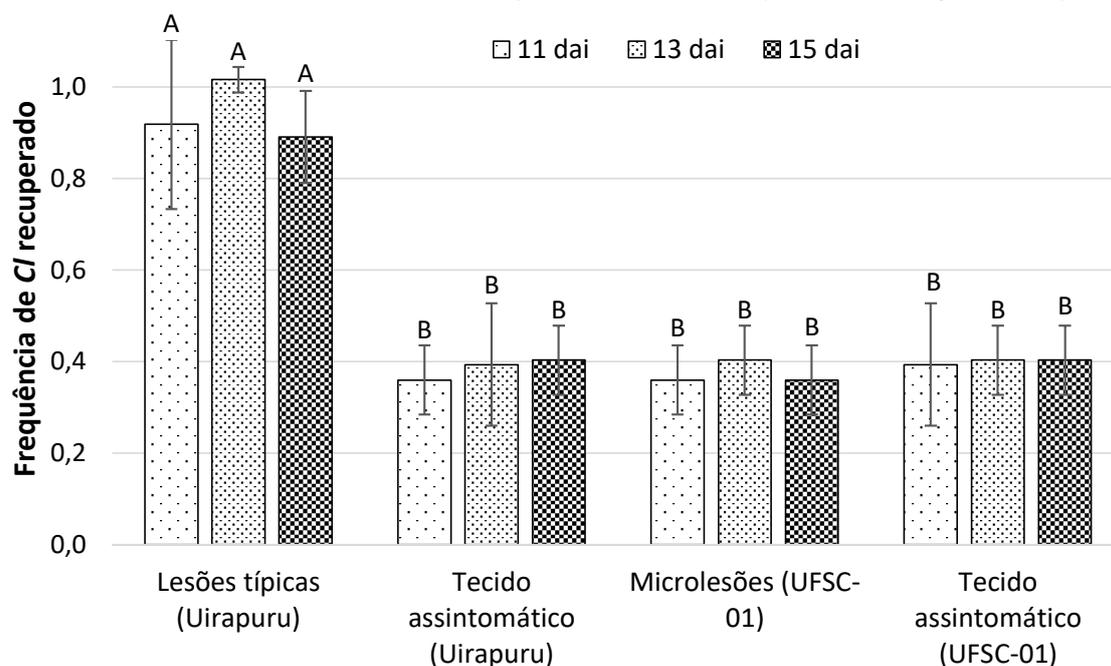
Valor em μmol/g de peso fresco.

Apêndice 3 - Células hipersensíveis em feijoeiros suscetíveis (cv. Uirapuru), resistentes (UFSC-01) e controle (feijoeiros não inoculadas), inoculados com não com *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), 0, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas indicam diferença entre linhas (teste de Tukey, P≤0,05). *** indica diferença significativa entre o valor de P ≅ 0, ** ≤ 0,01 e * ≤ 0,05 no teste ANOVA.

Genótipo	Horas após a inoculação				Pr(>F)
	0	12	24	48	
cv. Uirapuru	1.66Ac	5.27Ac	10.69Ab	16.94Aa	1.36 ^{-6***}
UFSC-01	1.96Ad	11.66Bc	24.16Bb	46.38Ba	5.15 ^{-10***}
Control	1.70Aa	1.96Ca	2.01Ca	2.06Ca	0.0621
Pr(>F)		0.837	8.01 ^{6***}	1.35 ^{-5***}	1.13 ^{-5***}

Valor em número de células hipersensitivas/cm²

Apêndice 4 - Frequência de *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl) recuperado de tecidos foliares com lesões (cv. Uirapuru) e microlesões (UFSC-01) típicas de antracnose e de tecidos assintomáticos de feijoeiros inoculados. dai: dias após a inoculação. Os dados foram transformados pela aplicação da raiz quadrada ($\sqrt{x+0,1}$) e submetidos às análises estatísticas. Letras indicam diferença entre as médias (teste de Tukey, $P \leq 0,05$)



APÊNDICE B – Dados geográficos populacionais

Apêndice 5 - Estimativa da população dos estados brasileiros que preferem o feijão preto para consumo.

Estado	População (habitantes)
Paraná	11.433.957
Santa Catarina	7.164.788
Rio Grande do Sul	11.377.239
Rio de Janeiro	17.264.943
Espírito Santo	4.018.650
Total	51.259.577

Fonte: IBGE (2019).