



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico  
e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de  
*Rhizobium tropici***

**LUCAS JOSÉ DE SOUSA**

**Brasília - DF**  
**2020**

**LUCAS JOSÉ DE SOUSA**

**Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici***

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

**Orientador**

Luiz Eduardo Bassay Blum

**Co-orientadora**

Angela Mehta dos Reis

**Brasília – DF  
Distrito Federal - Brasil  
2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, L.J. **Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici***

/ Lucas José de Sousa

Brasília - DF, 2020.

p. 79

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,  
Universidade de Brasília – UnB.

1. *Cicer arietinum* L., Filogenia molecular, Resistência induzida, RT-qPCR

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici*.

*Aos meus pais,  
Joaquim e Luzia*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me fortalecido, dado sabedoria, conhecimento e colocado boas pessoas em minha vida ao longo do mestrado.

Aos meus pais Joaquim e Luzia, por todo exemplo de respeito, caráter e o apoio dado em busca dos meus objetivos.

A todos os meus familiares que sempre torceram a favor e acreditaram em mim.

A Veronica pela amizade de sempre.

Ao Guilherme Brant pelo companheirismo e toda ajuda dada para o desenvolvimento do meu trabalho.

A Universidade de Brasília, ao departamento de Fitopatologia e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por dado a oportunidade de aprender e desenvolver a minha pesquisa.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao meu orientador Blum pela orientação, paciência, compreensibilidade e apoio para o desenvolvimento do meu trabalho.

A minha co-orientadora Angela pela orientação e apoio das minhas ideias. Muito obrigado pelo suporte oferecido.

Ao Professor Danilo, por todo o conhecimento repassado e colaboração em parte deste projeto.

A minha ex-orientadora Klenia, por sempre ter me motivado a fazer um curso de pós-graduação e sempre ter torcido pelo meu sucesso.

A Bianca pela motivação no desenvolvimento do trabalho e por colaborar com parte deste.

A mi mopri Jefferson por los consejos dados y toda la amistad durante mi maestria.

Ao Ivonaldo pelo auxílio nos experimentos de bancada.

As professoras Thaís e Michelle, pelo aceite em participar da banca de defesa e colaborar com meu aprendizado.

Aos técnicos de laboratório Kamila e César.

Aos amigos que fiz durante o mestrado e colaboraram de forma direta ou indireta, Amanda, Sérgio, Jefferson, Bianca, Paula, Adriana, Juliana, Tainara, João Lucas, Vitória, Vitor, Ikaró, Leila, Sheila, Karol e Mari.

Por fim, meu muito obrigado a todos que contribuíram com minha formação!!

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Luiz Eduardo Bassay Blum, e co-orientação da pesquisadora Angela Mehta dos Reis da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF.

**Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici***

LUCAS JOSÉ DE SOUSA

DISSERTAÇÃO APROVADA em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup> Michelle Souza Vilela  
Examinadora Externo

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr.<sup>a</sup> Thaís Ribeiro Santiago  
Examinadora interno

---

Prof. Dr. Luiz Eduardo Bassay Blum  
Orientador (Presidente)

Brasília – DF  
Distrito Federal - Brasil  
2020

## SUMÁRIO

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>v</b>
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1 Objetivos gerais .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
3.1 A Cultura do Grão de bico ( <i>Cicer arietinum</i> L.) .....	5
3.2 Murcha vascular .....	7
3.3 Podridão negra da raiz .....	8
3.4 Conceito de espécie nos complexos <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Fusarium solani</i> .....	8
3.5 Controle das doenças causadas por <i>Fusarium</i> spp. ....	10
3.6 Indução de resistência em plantas .....	12
3.7 Proteínas relacionadas a patogênese (PR) .....	13
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1 Obtenção dos isolados .....	16
4.2 Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	17
4.3 Caracterização morfológica dos isolados .....	18
4.4 Caracterização filogenética dos isolados .....	18
<b>4.4.1 Extração do DNA genômico</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4.2 Amplificação do DNA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4.3 Análise filogenética</b> .....	<b>19</b>
4.5 Expressão de genes de defesa em plantas de grão de bico tratadas com Extrato de <i>Rhizobium tropici</i> (ERT) .....	20
<b>4.5.1 Obtenção do material vegetal</b> .....	<b>20</b>
<b>4.5.2 Seleção dos genes envolvidos na indução de resistência e desenho dos iniciadores</b> .....	<b>21</b>
<b>4.5.3 Extração do RNA total de plantas de grão de bico</b> .....	<b>23</b>
<b>4.5.4 Tratamento das amostras com DNase</b> .....	<b>23</b>
<b>4.5.5 Síntese do DNA complementar (cDNA)</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5.6 Validação dos iniciadores e do cDNA</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5.7 Análise da expressão gênica por RT-qPCR</b> .....	<b>25</b>

<b>4.5.8 Análise dos dados.....</b>	<b>25</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
5.1 Teste de patogenicidade.....	27
5.2 Caracterização cultural e morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	29
5.3 Caracterização filogenética de <i>Fusarium</i> spp.....	33
5.4 Expressão de genes de defesa em grão de bico com uso de ERT por meio de RT-qPCR .	36
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
6.1 Caracterização morfológica dos isolados .....	41
6.2 Análise filogenética dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	42
6.3 Expressão de genes de defesa em grão de bico com uso de Extrato de <i>Rhizobium tropici</i> (ERT) por meio de RT-qPCR.....	44
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Famílias e principais propriedades bioquímicas das proteínas PR.....	14
<b>Tabela 2.</b> Genes de defesa e referências usados para análise de RT-qPCR.....	22
<b>Tabela 3.</b> Características culturais e morfológica dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. ....	30

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Locais de coleta de plantas de grão de bico apresentando sintomas das doenças.....	17
<b>Figura 2.</b> Sintomas induzidos por <i>Fusarium oxysporum</i> em plantas de grão de bico A) murcha e amarelecimento B) Plantas saudias, não inoculadas.....	27
<b>Figura 3.</b> Sintomas induzidos por <i>Fusarium oxysporum</i> em planta de grão de bico A) Descoloração do sistema vascular B) Sistema vascular sadio, planta não inoculada.....	28
<b>Figura 4.</b> Sintomas induzidos por <i>Fusarium falciforme</i> em planta de grão de bico A) Podridão radicular B) Sistema radicular sadio, planta não inoculada.....	28
<b>Figura 5.</b> Características morfológicas e culturais dos isolados de <i>F. oxysporum</i> . A) superfície da colônia. B) Verso da colônia. C) Esporodóquios formados na superfície da folha de cravo D) Macroconídios produzidos em fiáldes curtas E) Macroconídios F) Microconídios G) Clamidósporo intercelular .....	31
<b>Figura 6.</b> Características morfológicas dos isolados de FSSC. A) superfície da colônia. B) Verso da colônia. C) Falsas cabeças formadas em conidióforo. D) Macroconídio. E) Microconídios. F) Clamidósporo intercelular.....	32
<b>Figura 7.</b> Filograma dos isolados do complexo de espécies <i>Fusarium oxysporum</i> obtido por meio de Inferência Bayesiana com base em sequências de <i>Rpb2</i> . A árvore foi enraizada com <i>Fusarium foetens</i> .....	34
<b>Figura 8.</b> Filograma dos isolados do complexo de espécies <i>Fusarium solani</i> obtido Inferência Bayesiana com base em sequências de <i>Rpb2</i> . A árvore foi enraizada com <i>Fusarium staphyleae</i> .....	35
<b>Figura 9.</b> Eletroforese em gel de agarose A) RNA total das amostras de raízes de grão de bico. B) Amostras de RNA total tratadas com 0,2 µL da enzima DNase. A figura mostra os tempos 0h (plantas testemunha), 24h e 48h analisados e as respectivas réplicas biológicas (RB) .....	36
<b>Figura 10.</b> Gráfico mostrando ausência de amplificação das amostras de RNA tratadas com DNase. ....	36
<b>Figura 11.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir dos cDNAs diluídos em 10x. A figura mostra os tempos 0 h (plantas testemunha), 24 h e 48 h após o tratamento com ERT analisados e as respectivas réplicas biológicas (RB).....	37

<b>Figura 12.</b> Curva de dissociação obtida para cada par de primer dos 8 genes candidatos.....	38
<b>Figura 13.</b> Média da estabilidade de expressão dos genes de referência.....	39
<b>Figura 14.</b> Análise da expressão relativa dos genes de defesa em raízes de grão de bico 24 e 48 horas após a aplicação de ERT. As barras que apresentam asterisco (*) possuem diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) em relação a testemunha (plantas tratadas com água).....	40

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Códigos de acessos no GenBank dos isolados do complexo de espécies <i>Fusarium oxysporum</i> utilizados na análise filogenética.....	62
<b>Anexo 2.</b> Códigos de acessos no GenBank dos isolados do complexo de espécies <i>Fusarium solani</i> utilizados na análise filogenética.....	63
<b>Anexo 3.</b> Relative Expression Report.....	65

## RESUMO GERAL

SOUSA, L.J. **Identificação de espécies de *Fusarium* patogênicas ao grão de bico e indução de genes relacionados a defesa com o uso de extrato de *Rhizobium tropici***. 2020. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília - DF.

A murcha vascular causada por fungos do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC) e a podridão negra das raízes causada pelo complexo de espécies *Fusarium solani* (FSSC) são algumas das principais doenças que reduzem a produção do grão de bico. O controle dessas doenças tem sido difícil, devido a variabilidade genética e a ampla gama de hospedeiros do patógeno. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética das espécies de *Fusarium* que afetam o grão de bico cultivado em Goiás e no Distrito Federal, além de avaliar a indução de genes de defesa em plantas de grão de bico submetidas ao tratamento com extrato de *Rhizobium tropici* (ERT). Isolados de *Fusarium* foram obtidos a partir de raízes de plantas de grão de bico apresentando sintomas de murcha, amarelecimento e podridão negra das raízes. A partir dessas culturas, precedeu-se a caracterização morfológica no meio de cultura SNA e BDA. Para a identificação molecular, foi realizada a extração de DNA, seguida de amplificação de uma região parcial do gene *Rpb2*, purificação dos fragmentos e o subsequente sequenciamento. Os resultados demonstraram variações nas características culturais e morfológicas entre os isolados. As análises filogenéticas mostraram que a maioria dos isolados do FOSC agruparam com outras espécies de *Fusarium* que são patogênicas a soja, feijão, algodão, banana, entre outras, enquanto que os isolados do FSSC foram agrupados com *Fusarium falciforme* em um único clado. Embora a identificação precisa não tenha sido possível usando apenas um gene, os resultados indicam a presença de dois complexos de espécies. Visando desenvolver metodologias para auxiliar no controle das doenças causadas por FOSC e FSSC, foi verificada a indução de genes de defesa na planta após tratamento com ERT. Raízes de grão de bico cv. Cícero foram coletadas 24 h e 48 h após a aplicação de ERT e comparadas a plantas inoculadas com água. Posteriormente, as amostras das raízes foram utilizadas para a purificação de RNA total, seguido do tratamento com DNase para a síntese do cDNA. Os resultados obtidos mostraram que em 24 h os genes que codificam as proteínas *LOX 1*, *DOX 1*, *CAT 4*, *PER 10* e *PAL 2* tiveram a expressão regulada positivamente quando comparados ao controle. Em 48 h a expressão dos genes que codificam as proteínas *LOX 1*, *PER 10* foi maior estatisticamente quando comparada ao tempo de 24 h, enquanto que os demais genes mantiveram o nível de expressão. Estes resultados sugerem que o ERT foi eficiente na indução da maioria dos genes de defesa avaliados, podendo ser uma alternativa para auxiliar no controle de doenças em plantas.

**Palavras-chave:** *Cicer arietinum* L., Filogenia molecular, Indução de resistência, RT-qPCR.

---

Orientador – Luiz Eduardo Bassay Blum – Universidade de Brasília

Co-orientadora – Angela Mehta dos Reis – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## GENERAL ABSTRACT

SOUSA, L.J. **Identification of pathogenic species of *Fusarium* in chickpea and induction of defense-related genes using *Rhizobium tropici* extract.** 2020. 79p. Dissertation (Master in Plant Pathology) – Universidade de Brasília, Brasília - DF, Brazil.

*Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) and black rot of roots caused by *Fusarium solani* species complex (FSSC) are some of the major diseases that reduce chickpea production. The control of these diseases has been difficult due to genetic variability and the wide host range of the pathogen. Therefore, the aim of this study was to perform a morphological and genetic variability characterization of *Fusarium* species that affect chickpea in Goiás and Distrito Federal in Brazil. *Fusarium* isolates were obtained from roots of chickpea plants showing wilt, yellowing and black rot of roots. For the morphological characterization, SNA and PDA media were used. For molecular characterization, DNA extraction was performed and a region of the *Rpb2* gene was amplified. The PCR products obtained were purified and sequenced. The results showed variation both cultural and morphological characteristics. The phylogenetic analyses showed FOSC isolates were clustered with other *Fusarium* pathogenic to soybeans, beans, cotton, banana, etc., while the FSSC isolates were clustered with *Fusarium falciforme* into a single clade. Although an accurate species identification was not possible using only one gene, the results indicate the presence of two species complex. In order to develop control measures for the diseases caused by FOSC and FSSC, we also evaluated the induction of defense-related genes in chickpea plants after the application of *Rhizobium tropici* extract (ERT). Roots of cultivar Cicero were collected 24 and 48 hours after treatment with ERT and compared to plants treated with water. The samples of roots were used for total RNA extraction and subsequently for cDNA synthesis. The results obtained at 24h showed that the expression of genes encoding *LOX 1*, *DOX 1*, *CAT 4*, *PER 10* and *PAL 2* proteins were upregulated when compared to the control. At 48 h the expression of genes encoding *LOX 1* and *PER 10* proteins were upregulated when compared to the control, while the other genes maintained the same expression levels observed at 24 h. These results suggest that ERT was efficient in inducing most of the defense genes evaluated and may represent an alternative measure to control plant diseases.

Keywords: *Cicer arietinum* L., Molecular phylogeny, Induced resistance, RT-qPCR.

---

Advisor: Luiz Eduardo Bassay Blum – Universidade de Brasília

Co-advisor: Angela Mehta dos Reis– Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## 1. INTRODUÇÃO

O grão de bico (*Cicer arietinum* L.) possui grande importância econômica mundial devido a utilização do grão na alimentação humana, sendo considerado uma fonte rica em proteína de baixo custo, composta por aminoácidos essenciais ricos em lisina, que complementam dietas sem a proteína animal (SINGH et al., 2007b). Além disso, o grão é fonte de carboidratos, vitaminas, fibras e minerais, especialmente cálcio, ferro, fósforo e magnésio (AVANCINI et al., 1992).

Os dados da FAO (2018) mostraram que a produção mundial de grão de bico foi de 17 milhões de toneladas, sendo que a Índia foi responsável por mais de 64% desta produção, alcançando 11 milhões de toneladas e com produtividade de 956 kg/ha<sup>-1</sup>, seguido pela Austrália com produção de 998 mil toneladas e produtividade de 928 kg/ha<sup>-1</sup>, Turquia com 630 mil toneladas e produtividade de 1225,4 kg/ha<sup>-1</sup> e a Rússia 620 mil toneladas e produtividade de 757,2 kg/ha<sup>-1</sup>.

Tanto a produção brasileira quanto o consumo do grão de bico ainda são baixos em relação a outras leguminosas, o que torna o país importador do produto para atender a demanda crescente dos consumidores. Embora não existam dados de produção do grão no Brasil, pesquisas revelam que o país possui potencialidade para produção, devido a adaptabilidade da cultura às condições edafoclimáticas de várias regiões (BRAGA et al., 1997; HOSKEM, 2014; ARTIAGA et al., 2015; AVELAR, 2016). Entretanto, o desenvolvimento e a produtividade da cultura podem ser limitados por vários fatores, como por exemplo a falta de umidade e nutrientes no solo e a ocorrência de pragas e doenças como insetos, fungos, bactérias, vírus e nematoides (NENE et al., 2012).

Dentre as doenças causadas por fungos, destacam-se os microrganismos habitantes do solo, como a murcha vascular, associada ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Matuo & K. Satô, que em todo o mundo causa perdas de 10 – 15 % anualmente (MICHIELSE & REP, 2009). *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. é responsável pela doença conhecida como podridão negra da raiz em grão de bico que, embora menos importante que a murcha vascular, também pode levar a perdas significativas na produção (NENE et al., 2012).

As informações sobre as espécies de *Fusarium* afetando grão de bico no Brasil ainda são escassas. Azevedo et al., (2017) fizeram a identificação morfológica e filogenética de 14 isolados de *Fusarium* coletados em grão de bico cultivado em Cristalina – GO e verificaram que os isolados pertencentes ao *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC) foram

agrupados em um único clado, separado de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* e os isolados de *Fusarium solani* tiveram como grupo irmão *Fusarium falciforme* (Carrion) Summerb. & Schroers, associado ao solo e infecções humanas. A ocorrência de *Fusarium solani* em grão de bico no Brasil também foi relatado por CABRAL et al., (2016), que demonstraram por recursos filogenéticos a proximidade dos fungos isolados com *F. falciforme*.

O manejo destes patógenos têm sido difícil devido à variabilidade patogênica em diferentes cultivares, impondo limitações ao emprego da resistência genética, pois não há cultivares com amplo espectro de resistência a raças distintas do patógeno (ALLOOSH et al., 2019). Considerando que o manejo deve ser focado nas raças predominantes na área, o conhecimento sobre a variabilidade genética e patogênica existente na população do patógeno é importante para traçar as melhores medidas de controle (MICHEREFF et al., 2005).

Estes fungos possuem a capacidade de persistir no solo por um longo período na ausência de hospedeiro por meio de clamidósporos, sendo a rotação de cultura pouco eficiente e portanto, o manejo é feito de forma preventiva, por meio do tratamento de sementes com o uso de fungicidas erradicantes e protetivos (GASCO et al., 2005; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2015; JENDOUBI et al., 2017). Porém, no Brasil não há registros de defensivos agrícolas para o controle de *Fusarium* na cultura do grão de bico (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2019). Além disso, o uso de agrotóxicos fitossanitários estão sujeitos a críticas da sociedade, em decorrência dos problemas ambientais e de saúde humana, e portanto, o estudo de estratégias que visam o controle do patógeno de forma sustentável é importante (STENERSEN, 2004; MITRA et al., 2011).

Neste contexto, a indução de resistência da planta hospedeira pode ser uma ferramenta promissora e alternativa no controle de doenças, pois não exibe ação tóxica direta ao patógeno. Alguns compostos possuem a capacidade de induzir o sistema de defesa das plantas, desencadeando uma série de alterações físicas e bioquímicas, como por exemplo, a síntese de enzimas relacionadas a defesa contra patógenos (LLORENS et al., 2017). Essas enzimas atuam de diferentes formas que podem reduzir o dano causado pelo patógeno, seja pela ação direta, inibindo o crescimento ou ainda através da síntese de componentes da parede celular vegetal que confere melhor rigidez para enfrentar a penetração pelo patógeno (ZAREIE et al., 2002).

Tendo em vista as perdas causadas por essas doenças e as dificuldades para o manejo, o presente estudo busca identificar isolados de *Fusarium* spp. causadores das doenças em grão de bico provenientes de diferentes regiões produtoras, através da caracterização morfológica e

filogenética. Pretende-se também verificar a capacidade do extrato de *Rhizobium tropici* de induzir genes relacionados a defesa na planta.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Realizar a caracterização morfológica e filogenética de isolados de *Fusarium*, bem como verificar a capacidade do extrato de *Rhizobium tropici* de induzir genes relacionados a defesa da planta.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter isolados de *Fusarium* provenientes de diferentes regiões produtoras de grão de bico em Goiás e no Distrito Federal.
- Testar a patogenicidade dos isolados na cultivar Cícero.
- Caracterizar morfológicamente os isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp.
- Caracterizar molecularmente os isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp.
- Verificar a expressão de genes de defesa em grão de bico após a aplicação de extrato de *Rhizobium tropici*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A Cultura do Grão de bico (*Cicer arietinum* L.)

O grão de bico é originário do sudeste da Turquia nas adjacências com a Síria, e foi levado para a Índia e países europeus (MAESEN, 1987). Apesar de ser típico de climas temperados, o melhoramento vegetal proporcionou o cultivo em regiões de climas subtropicais e tropicais da África, América do Norte, Austrália e Brasil (NASCIMENTO et al., 1998). É considerada a quinta leguminosa mais cultivada no mundo, perdendo para a soja, amendoim, feijão e ervilha, sendo o cultivo presente em mais de 56 países que somam um total de 17 milhões de toneladas (FAO, 2018).

O grão de bico é pertencente a tribo *Ciceraceae*, família *Fabaceae*, subfamília *Papilionaceae* e gênero *Cicer*, que possui nove espécies de cultivo anual e 35 espécies de ciclo perene, sendo que apenas a espécie *C. arietinum* L. possui importância econômica (SINGH & DIWAKAR, 1995). O grão de bico é uma planta diploide ( $2n = 16$ ), que se autopoliniza produzindo vagens com uma ou duas sementes (COBOS et al., 2007). As sementes são divididas em dois tipos, as oriundas de flores roxas, que são pequenas, escuras e angulosas e pertencem ao tipo Desi, enquanto que as do tipo Kabuli são oriundas de flores brancas, grandes e possuem coloração creme (SINGH & DIWAKAR, 1995).

As plantas são herbáceas de ciclo anual, podendo ter genótipos de porte ereto ou rasteiro com altura média variando de 25 a 70 cm e geralmente possuem hábito de crescimento indeterminado, em que o crescimento vegetativo continua mesmo após o início do florescimento (GAUR et al., 2010). As folhas são imparipenadas com cerca de 5 mm de comprimento variando das tonalidades verde amarelo para verde azulado escuro. A época de cultivo é variável conforme a região de cultivo. Nos países tropicais o cultivo é feito geralmente no inverno, enquanto que nas regiões de clima frio é feito no verão ou na primavera (SINGH & DIWAKAR, 1995; CARRERAS et al., 2016).

O grão de bico é adaptado a solos arenosos, bem drenados com pH próximo ao neutro e possui pouca exigência hídrica (CARRERAS et al., 2016). O ciclo da cultura varia entre 95 e 110 dias, sendo que as cultivares com ciclo longo possuem sistema radicular mais extenso do que as cultivares de ciclo precoce, que condicionam uma melhor tolerância ao estresse hídrico (SHARMA, 1984). Além disso, as raízes se associam a bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rhizobium*, formando nódulos radiculares que desempenham papel importante para o cultivo em locais deficientes em nitrogênio (GAUR et al., 2010).

O grão de bico possui grande importância alimentícia, além de ser usado na indústria e medicina popular. O grão pode ser consumido fresco, seco, frito, torrado e cozido, além de ser usado como produto para fabricação de farinha, que é utilizada na fabricação de sopas, pastas e pães (WILLIAMS & SINGH, 1988). O grão de bico possui propriedade anti-helmíntica, por isso é utilizado na medicina tradicional para expulsar vermes parasitas de humanos. Além disso, possui a capacidade de reduzir dores estomacais e alguns medicamentos são preparados de grão de bico e usados para tratar problemas na garganta, doenças sanguíneas, bronquite, doenças de pele e problemas relacionados ao fígado ou à vesícula biliar (ZIA-UL-HAQ et al., 2007). O grão de bico também pode ser utilizado para fabricação de cola, que é usada na indústria de compensados. Embora não haja resistência a água, o amido do grão é usado na indústria de tecelagem para dar um toque de seda e amaciar tecidos (MAITI & WESCHE-EBELING, 2001).

O mercado internacional de grão de bico é muito ativo, devido às propriedades nutricionais do grão, sendo considerado uma fonte rica e barata de proteínas, especialmente para os países asiáticos, como a Índia, que possui uma grande parte da população vegetariana (JENDOUBI et al., 2017). Em função disso, a Índia é responsável por mais da metade da produção mundial, entretanto, a produtividade da cultura é baixa em relação ao potencial produtivo da cultura (FAO, 2018).

A falta de recursos agrotecnológicos podem interferir na produtividade do grão de bico, tais como a falta de sementes tolerantes a seca e doenças ou de boa qualidade fitossanitária, nutrientes no solo, irrigação, etc (CHATURVEDI et al., 2018). Com relação as doenças, cerca de 172 patógenos já foram relatados na cultura, entretanto nem todos possuem a capacidade de causar prejuízos econômicos (NENE et al., 2012).

Dentre esses patógenos, destacam-se os fungos habitantes do solo que podem comprometer o desenvolvimento inicial das plantas, como a murcha vascular que está amplamente associada a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, a podridão radicular causada por *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler, a podridão do colo causada por *Sclerotium rolfsii* Sacc. e a podridão negra das raízes causada por *F. Solani* (NENE et al., 2012). Em relação as doenças em grão de bico ocorrentes no Brasil, já foi relatado *F. oxysporum* (AZEVEDO et al., 2017), espécies do complexo *Fusarium solani* (FSSC) (CABRAL et al., 2016) e a bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* (SALCEDO et al., 2017).

### 3.2 Murcha vascular

A murcha vascular causada por fungos do complexo de espécies de *F. oxysporum* (=Inglês *Fusarium oxysporum* species complex - FOSC) é a principal doença que afeta a produção de grão de bico no mundo (HAWARE & NENE, 1982; JIMENEZ-DIAZ et al., 1989; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 1993). Fungos deste complexo pertencem ao filo *Ascomycota*, ordem *Hypocreales* e família *Nectriaceae*, sendo frequentemente encontrados na fase anamórfica (YUN et al., 2000). A doença tem comprometido a produção em vários países, levando a perdas anuais de 10 - 15%, podendo chegar a 60 - 70% e de 100% em epidemias graves, em que há alta suscetibilidade do hospedeiro e condições edafoclimáticas para o desenvolvimento da doença (NENE et al., 2012). O desenvolvimento da doença é favorecido quando o plantio é feito em locais de temperatura médias de 25°C, solos leves, arenosos, alcalinos e úmidos (SINGH et al., 2007a).

Na ausência das condições ideais para o progresso da doença, o fungo sobrevive em forma de clamidósporos por um longo período, que são estimulados a germinar através de exsudatos liberados pelas raízes e estabelecer relações interparasitárias com o hospedeiro, por meio da aderência na superfície radicular e formação de micélio para penetrar o tecido vegetal através de ferimentos, pontos de formação das raízes laterais ou ainda de forma direta mediante a formação do tubo germinativo (LESLIE & SUMMERELL, 2006). O micélio atravessa o córtex da raiz intercelularmente e atinge os vasos do xilema, ramifica e produz os microconídios que são transportados sistemicamente na planta, podendo atingir as sementes (SHARMA et al., 2016).

Devido ao processo de colonização nos vasos do xilema, o fluxo de água e nutrientes das raízes para a parte superior da planta é reduzido, resultando em murcha, amarelecimento, necrose das folhas, queda dos pecíolos, raques e morte da planta (JENDOUBI et al., 2017). Os sintomas da doença podem aparecer em qualquer fase do estágio fenológico da cultura, a partir de 25 dias após a semeadura em campo, sendo mais comum o aparecimento cerca de 6 a 8 semanas após a semeadura que é o início do estágio de floração (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2015).

As diferentes linhagens de *F. oxysporum* que afetam o grão de bico são divididas em dois patótipos sendo que a espécie possui 8 raças até o momento. As raças 0 e 1B/C pertencem ao patótipo do amarelecimento, que ocorre de forma progressiva na planta, causando descoloração vascular morte tardia da planta. O patótipo da murcha vascular compreende nas raças 1A, 2, 3, 4, 5, que após a infecção causam clorose rápida e grave das folhas, flacidez do

caule, descoloração vascular e morte precoce da planta (JIMENEZ-GASCO et al., 2003; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

### 3.3 Podridão negra da raiz

O fungo *F. solani* (Teleomorfo *Haemanectria haematococca* (Berk. & Broome) Samuels & Rossman, filo *Ascomycota*, ordem *Hypocreales*) possui uma grande gama de hospedeiros, que inclui patógenos de plantas, humanos e animais (LESLIE & SUMMERELL, 2006). O grão de bico e um hospedeiro deste patógeno, que provoca a podridão negra das raízes e está associada ao complexo de espécies de *F. solani* (=Inglês *Fusarium solani* species complex - FSSC) (CABRAL et al., 2016; ŠIŠI et al., 2018). A doença já foi relatada em vários países que produz grão de bico, sendo que em alguns deles está associada a *F. solani* f. sp. *pisi*, que além de afetar ervilha (*Pisum sativum*) possui ampla gama de hospedeiros (WESTERLUND et al., 1973; HASANZADE et al., 2008; ŠIŠI et al., 2018).

Apesar de ser considerado um patógeno com importância secundária na cultura, o fungo pode causar perdas de rendimento nas áreas presentes. A doença é favorecida por solo úmido em excesso e altas temperatura entre 25-30°C e pode ocorrer em qualquer etapa do desenvolvimento da planta (NENE et al., 2012).

Na ausência dessas condições o fungo sobrevive no solo por longo período na forma de clamidósporos, que possui membrana bastante espessa (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Os sintomas são caracterizados pelo amarelecimento e senescência precoce das plantas, além da podridão das raízes, que apresentam-se mais finas e a raiz principal enegrecida, as plantas afetadas podem continuar a produzir novas raízes desde que haja umidade suficiente no solo (NENE et al., 2012).

### 3.4 Conceito de espécie nos complexos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*

O gênero *Fusarium* contém algumas das espécies de fungos mais importantes economicamente, devido a ampla gama de hospedeiros e aos danos diretos na agricultura, além de danos indiretos, pela capacidade de algumas espécies produzir micotoxinas (MICHIELSE & REP, 2009; WOLOSHUK & SHIM, 2013). A identificação correta do agente causal de uma doença permite traçar medidas corretas para o manejo. Para a identificação de espécies do gênero *Fusarium*, deve-se observar os sintomas causados na planta, as condições climáticas em

que a doença ocorreu, seguido do isolamento para a aplicação dos conceitos de espécie morfológica, biológica e filogenética (SUMMERELL et al., 2003).

A caracterização baseada na morfologia envolve a obtenção da cultura pura do isolado, crescimento em meios de culturas e temperaturas apropriados para a avaliação das características culturais e morfológicas, como a taxa de crescimento, pigmentação de colônia, tipo de conidióforo e fiálides, formato e tamanho de macro e microconídios e presença ou ausência de clamidósporos (GERLACH & NIREMBERG, 1982; LESLIE & SUMMERELL, 2006). A morfologia do fungo é importante para a descrição da espécie, entretanto, a escassez de caracteres morfológicos limita o uso deste conceito (LIMA et al., 2012).

A aplicação do conceito biológico de espécie em *Fusarium* (=Inglês *Mating population* - MPs) leva em consideração os indivíduos ou populações que possuem a capacidade intercruzante e de reproduzir de forma sexuada para gerar descendentes férteis. O *F. solani* possui sete espécies biológicas, que são classificadas em MPs I-VII e *Nectria haematococca* é a forma sexual mais referida (MATUO & SNYDER, 1973).

O *F. oxysporum* não possui forma sexual conhecida, embora que molecularmente tenha-se definido a fase teleomórfica como *Gibberella* (O'DONNELL & NIRENBERG, 1998). Diante da ausência da forma sexual, a espécie possui mecanismos parassexuais entre isolados heterocarióticos para ocorrer variabilidade genética (LESLIE, 1993). Os fungos que apresentam esta capacidade são inseridos dentro de um mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (VCG), pois possuem haplótipos multilocus idênticos ou semelhantes pertencentes a mesma linhagem clonal (BAAYEN et al., 2000). O uso do conceito biológico pode não ser apropriado para a identificação de algumas espécies, pois pode ocorrer frequência desigual de alelos do *Mating type* em diferentes populações, falha na reprodução de isolados compatíveis devido a predominância masculina ou feminina ou simplesmente a falta de condições ambientais para a reprodução sexuada (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

As populações de *Fusarium* possuem bastante diversidade, evidenciado pelo número de *formae speciales* existentes (O'DONNELL, 2000). A denominação *formae speciales* refere-se a especificidade do patógeno em parasitar um determinado hospedeiro ou grupo de plantas, devido apresentar relações gene-a-gene (MICHIELSE & REP, 2009). Entretanto, com o uso de recursos filogenéticos este conceito pode ser questionável, como demonstrado por BAAYEN et al., (2000) ao comprovar que algumas *formae speciales* em *Fusarium oxysporum* possuem origem não-monofiléticas. Além disso, estudos relatam que algumas *formae speciales* não possuem especificidade patogênica a uma determinada espécie botânica, como por exemplo o

*F. solani* f.sp. *pisi* que é associado a ervilha (*Pisum sativum*) embora capaz de estabelecer relação parasítica com outros hospedeiros (ŠIŠI et al., 2018).

A variabilidade patogênica reflete em uma maior variabilidade genética de *F. solani*, que apresenta a consistência de subgrupo distintos, denominados em clados. O clado 1 é composto por *Fusarium illudens*, associado a planta *Beilschmiedia towa* e *Fusarium plagianthi*, associado a planta *Hoheria glabrata*. O clado 2 abrange pelo menos oito espécies filogenéticas associadas a podridão vermelha de raiz na soja e a podridão radicular seca do feijoeiro, que estão presentes no continente Americano (O`DONNELL, 2000; AOKI & DONNELL, 2005). O clado 3 é o maior e mais diverso de todos, composto por 18 linhagens associados ao solo, plantas e infecções humanas (O`DONNELL et al., 2008).

Atualmente, considera-se que *F. solani* é um complexo de espécies (FSSC) representado por pelo menos 60 espécies estabelecidas filogeneticamente através de recursos moleculares (O`DONNELL et al., 2008; NALIM et al., 2011; SCHROERS et al., 2016). *F. oxysporum* também é um complexo de espécies (FOSC), composto por mais de 144 *formae speciales* distintas filogeneticamente, mas que possuem características morfológicas semelhantes (GORDON, 2017).

O conceito de espécie filogenética em conjunto com a morfologia tem sido os mais empregados para a distinção de espécies do gênero *Fusarium*. A filogenia é feita através da amplificação e análise de sequências de DNA de genes selecionados, que permite produzir dados para a construção de filogramas que fornecem informações sobre a variabilidade e relações evolutivas (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Estudos mais recentes propõem a epitificação da espécie *F. oxysporum* e até o momento foi descrito 15 novas espécies foram descritas, baseado em diferenças morfológicas súteis e no alinhamento de sequências das regiões gênicas calmodulina (*CmdA*), segunda subunidade maior da RNA polimerase II dependente de DNA (*Rpb2*), fator de elongação 1-*apha* (*Tef1*) e  $\beta$ -tubulina (*Tub2*) (LOMBARD et al., 2019). As regiões gênicas *Tef1* e *Rpb2* possuem maior robustez e confiabilidade para o reconhecimento de espécies, pois apresentam alto nível de polimorfismo de sequência, mesmo para espécies estreitamente relacionadas, não possuem cópias não-ortólogas e são facilmente amplificados para todas as espécies do gênero utilizando pares únicos de primers (O`DONNELL et al., 2015).

### 3.5 Controle das doenças causadas por *Fusarium* spp.

O uso de variedades resistentes deve ser priorizado para o manejo da doença, por meio de variedades que possuam resistência a uma determinada raça do patógeno (LANDA et al., 2004; JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2015). Na ausência de cultivares resistentes, o controle da murcha vascular tem sido difícil, sendo que apenas uma medida de controle é ineficiente para restringir o patógeno (LANDA et al., 2004). Considerando que a doença é impulsionada pelo inóculo primário, as medidas de controle visando o princípio da exclusão têm sido as mais recomendadas. Nesse sentido, é importante fazer o uso de sementes livres do patógeno, evitando assim a entrada do fungo numa área não infestada (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2015).

Práticas culturais devem ser realizadas após a colheita, visando a remoção e queima de restos vegetais, para eliminar as estruturas do patógeno. Várias outras técnicas com potencial controle da doença são relatadas na literatura, entretanto algumas são impraticáveis em grandes campos, como por exemplo a solarização do solo, que é uma técnica cara e faz o uso de material plástico para cobrir o solo (JIMÉNEZ-DÍAZ & JIMÉNEZ-GASCO, 2011; MARZANI, 2017).

Os produtos químicos são os mais utilizados para o manejo das murchas vasculares, que é feito através da aplicação de fungicida via semente de forma preventiva, pois possuem a ação erradicante e/ou protetiva, para isso e utilizado fungicidas erradicantes eliminam os patógenos presentes nas sementes, evitando a disseminação do patógeno a longas distâncias, enquanto os fungicidas de ação protetiva protegem as sementes das infecções durante um período relativamente curto após o plantio (AZEVEDO, 2007). Alguns dos produtos utilizados para o tratamento de sementes são a base de benomyl, carbendazim, thiram e captana (HAWARE et al., 1978; NENE et al., 2012).

Apesar do controle químico ser bastante difundido, o uso pode trazer consequências às lavouras como, por exemplo, a seleção de patógenos resistentes, o surgimento de doenças secundárias, além da falta de especificidade ao patógeno, podendo eliminar microrganismos no solo que são benéficos à planta, além da preocupação no que diz respeito à qualidade ambiental e aos malefícios para a saúde do aplicador (PIRES et al., 2003).

O controle biológico pode ser feito pelo uso de produtos à base de microrganismos antagonistas, que leva algumas vantagens em relação ao controle químico, pois não deixam resíduos no solo, são eficazes e atuam de diferentes maneiras para restringir o patógeno (MORANDI & BETTIOL, 2008). Vários microrganismos foram descritos na literatura como potenciais biocontroladores, como por exemplo *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., além de efeito direto contra patógenos, estes microrganismos possuem ainda a

capacidade de indução de resistência em plantas (LANDA et al., 1997; PRASAD et al., 2002; SAIKIA et al., 2003, 2009; DUBEY et al., 2007; KUMARI & KHANNA, 2016; SMITHA et al., 2017). A indução de resistência em plantas é feita de forma preventiva e confere proteção contra uma gama de patógenos e oferece vantagens em relação as medidas convencionais de controle de doenças, como por redução no número de pulverizações de agrotóxicos, visto que as duas medidas podem ser empregadas em conjunto (BAIDER & COHEN, 2003).

### 3.6 Indução de resistência em plantas

Uma das formas de resistência das plantas contra fitopatógenos é a resistência induzida (IR) que confere uma resposta de amplo espectro e duração variável (WALTERS et al., 2013). A resistência induzida é baseada no fenômeno *priming*, em que as células se preparam para um eventual ataque por patógenos, dessa forma, a síntese de fitoalexina ou lignificação da parede celular ocorrem mais rapidamente do que durante a infecção primária pela patógeno, permitindo assim uma resposta mais eficaz à nova infecção (GOELLNER & CONRATH, 2008; CONRATH et al., 2009). Estudos recentes revelam que a adaptação das plantas a diferentes estresses bióticos é dependente de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações nas histonas, as quais estão intimamente associadas à reconfiguração da cromatina e contribuem para o processo de *priming* (ESPINAS et al., 2016).

Essa indução pode ser feita por meio da aplicação de agentes bióticos ou abióticos, como por exemplo, microrganismos, fragmentos da parede celular, extratos vegetais e produtos químicos sintéticos a base do acilbenzolar-S-metil, que é um análogo do ácido salicílico (WALTERS et al., 2013). O ácido jasmônico (AJ) e o ácido salicílico (AS) podem respectivamente desencadear a resistência sistêmica induzida (RSI) e a resistência sistêmica adquirida (SAR) (SPOEL & DONG, 2012).

A RSI é efetiva contra um amplo espectro de fitopatógenos e está relacionada com a colonização das raízes por microrganismos benéficos e não envolve a produção de proteínas relacionadas a patogênese - Proteínas PR. Este tipo de resistência é sistêmico e pode ser desencadeado por moléculas constituintes de células bacterianas, como o flagelo e por substâncias produzidas por elas, como exopolissacarídeos, sideróforos, antibióticos e compostos orgânicos voláteis (PIETERSE et al., 2014).

A SAR está associada com a produção das proteínas PR, mediada por uma via de sinalização envolvendo o ácido salicílico (AS) e se desenvolve local ou sistemicamente, para

atuar como resposta a infecção por algum patógeno que provoca lesões necróticas, sejam essas resultantes de uma infecção bem-sucedida ou de uma resposta de hipersensibilidade (HR) (DURRANT & DONG, 2004).

### 3.7 Proteínas relacionadas a patogênese (PR)

As proteínas relacionadas a patogênese possuem importância fundamental de sinalização no processo de defesa da planta quando submetida a situações de estresses, além de apresentarem toxicidade direta a fitopatógenos (DOKE et al., 1996). Essas proteínas foram relatadas primeiramente em folhas de fumo (*Nicotiana tabacum*) devido a resposta de hipersensibilidade causada pela infecção do *Tobacco mosaic virus* (TMV) (VAN LOON & VAN KAMMEN, 1970). As proteínas PR localizam-se predominantemente extracelularmente, possuem baixo peso molecular (10 a 40 kDa), são ácidas e possuem resistência à degradação proteolítica e a pH baixo (FERREIRA et al., 2007).

O critério para caracterizar uma proteína PR era em relação a síntese após a infecção por fitopatógenos (LOON & STRIEN, 1999). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que fungos e bactérias benéficas, bem como substâncias sinalizadores e fatores abióticos, como a clorose e necrose induzidas por toxinas, déficit hídrico, ferimentos, metais pesados e salinidade também atuam como elicitores, que levam a indução do acúmulo de proteínas PR em plantas (FERREIRA et al., 2007). Outras substâncias como o cloreto de mercúrio, etanol, bromo, ácido acetilsalicílico, ácido jasmônico, etileno, ácido salicílico (AS) e ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotiólico (BTH), também possuem capacidade de indução de genes que codificam proteínas PR (LAWTON et al., 1996; OOSTENDORP et al., 2001).

Em relação as bactérias benéficas, destaca-se o gênero *Rhizobium*, que tem sido utilizado na agricultura como biofertilizante e resultado em uma melhora das plantas em relação a situações de estresses, como uma maior tolerância a fungos de solo (AKHTAR et al., 2010; TAYLOR et al., 2014). Alguns estudos demonstram que o acúmulo de compostos fenólicos em raízes de grão de bico após inoculação com *Rhizobium* spp. estão envolvidos na defesa contra patógenos (ARFAOUI et al., 2007). Além disso, a bactéria possui a capacidade de produzir enzimas como  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, que levam a perda da integridade estrutural do micélio, devido a perfuração e degradação das hifas (KUMAR et al., 2011).

A bactéria *Rhizobium* possui mecanismos sofisticados de interação com plantas leguminosas para a produção de rizóbios, que são importantes para a fixação biológica de

nitrogênio. Durante este processo, a planta produz flavonoides, que são reconhecidos pela proteína NodD da bactéria, que se liga as regiões promotoras dos genes de nodulação (genes nod) e tem como produto os fatores de nodulação ou lipoquitoligosacarídeos (JANCZAREK et al., 2015; WANG et al., 2018). O uso dessas biomoléculas obtidas a partir do extrato de *Rhizobium tropici* tem sido relatado no incremento de produtividade em soja, devido a capacidade da bactéria de produzir compostos secundários, como por exemplo hormônios vegetal, lipoquitoligosacarídeos e exopolissacarídeos (MARKS et al., 2013). Os exopolissacarídeos possuem a capacidade de modular a expressão de genes das Proteínas PR e induzir a resistência contra patógenos (CASTRO & BACH, 2004).

A ativação dos genes de proteínas PR é regulada pela cascata de transdução de sinais mediada por ácido salicílico, etileno e o ácido jasmonico, em que a ação sinérgica entre eles levam ao aumento da expressão destes genes (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000). As proteínas PR estão classificadas em 17 famílias até o momento e numeradas conforme a ordem de descoberta e agrupadas de acordo com o peso molecular, funções biológicas e enzimáticas (Tabela 1) (VANLOON et al., 2006).

**Tabela 1.** Famílias e principais propriedades bioquímicas das proteínas PR

Família	Membro tipo	Propriedades bioquímicas
PR-1	PR-1a (tabaco)	Sequestro de esteróis
PR-2	PR-2 (tabaco)	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	P, Q (tabaco)	Quitinase classes I, II, IV-VII
PR-4	R (tabaco)	Quitinase classes I, II
PR-5	S (tabaco)	Similar à taumatina
PR-6	Inibidor I (tomateiro)	Inibidor de proteinase
PR-7	P69 (tomateiro)	Endoproteinase
PR-8	Quitinase (pepino)	Quitinase classe III
PR-9	“Peroxidase formadora de lignina” (tabaco)	Peroxidase
PR-10	“PR-1” (salsa)	Similar à ribonuclease
PR-11	Quitinase “classe V” (tabaco)	Quitinase classe I
PR-12	RS-AFP3 (rabanete)	Defensina
PR-13	THI2.1 (Arabidopsis)	Tionina
PR-14	LTP4 (cevada)	Proteína de transferência de lipídeo
PR-15	OxOa (germina) (cevada)	Oxalato oxidase
PR-16	OxOLP (cevada)	Similar a oxalato oxidase
PR-17	PRp27 (tabaco)	Desconhecida

Fonte: (Adaptado de VANLOON et al., 2006).

As proteínas PR possuem grande importância no sistema de defesa das plantas e atuam de diversas formas, como por exemplo a capacidade de degradação de polissacarídeos estruturais da parede celular ou alterações na arquitetura, que prejudicam no desenvolvimento de fungos (ZAREIE et al., 2002). Essa capacidade antifúngica é relatada para as defensinas (DEF),  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinases (CHI) (COLLINGE et al., 1993; STOTZ et al., 2009).

Outro exemplo de modo de ação é relatado para a enzima catalase (CAT), que atua na prevenção do estresse oxidativo das células (MHAMDI et al., 2010). Além disso, as proteínas PR estão relacionadas a vias de sinalização, como por exemplo a lipoxigenase (LOX) e a dioxigenase (DOX) que iniciam em conjunto a síntese de oxilipinas, que por sua vez participa do processo de ativação da defesa das plantas, devido a peroxidação de lipídeos, além da capacidade de inibição direta do patógeno e acumulação de fitoalexina (FARMAKI et al., 2006; CASTRESANA, 2011). A fenilalanina amônia-liase (PAL) também está envolvida no acúmulo de fitoalexinas, bem como de compostos fenólicos (HYUN et al., 2011). As peroxidases (PER) atuam de forma constitutiva, através da formação de lignina, que pode levar a uma melhor resistência do tecido vegetal à penetração por patógenos (PASSARDI et al., 2004).

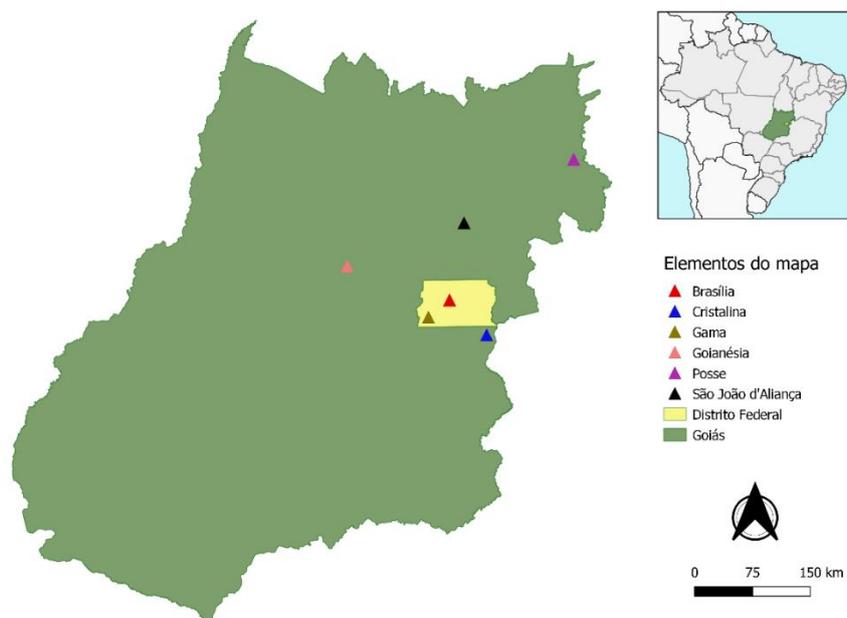
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas, na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília e no Laboratório de Genômica e Proteômica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

### 4.1 Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir das cultivares Cicero, Cristalino, BRS Aleppo e Jamú 96, que apresentavam sintomas característicos das doenças causadas por *Fusarium* spp., tais como o amarelecimento, descoloração vascular, murcha, podridão radicular e seca. Os municípios amostrados foram: Brasília – DF (3 isolados), Cristalina – GO (6), Goianésia – GO (1), São João d'Aliança – GO (2) e Posse – GO (7) (Figura 1). As plantas sintomáticas foram coletadas e levadas para o laboratório de Micologia onde procedeu-se o isolamento indireto. Para tanto, foram removidos fragmentos da interface do tecido sadio e doente com auxílio de um bisturi. Em seguida, os fragmentos de tecido foram desinfestados em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos, enxaguados três vezes em água destilada e esterilizada por 1 minuto e deixados secar sobre papel filtro esterilizado.

Posteriormente, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foi realizada a transferência dos fragmentos para placas com o meio de cultura o Czapek dox Agar acrescido com 20 mg/L de estreptomicina e neomicina. Em seguida, foram acondicionadas em câmara incubadora a 25 °C ( $\pm 2$ ) com fotoperíodo de 12h por 4 dias. Para garantir a pureza dos isolados foram obtidas culturas monohifais a partir de um segmento de hifa individual obtido de cultura em meio Ágar – Água 1% e transferido para placa de Petri contendo meio Batata dextrose ágar (BDA). As culturas monohifais foram incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Os isolados obtidos foram depositados na Coleção de Culturas da Universidade de Brasília e receberam os códigos CCUB.



**Figura 1.** Locais de coleta de plantas de grão de bico apresentando sintomas das doenças.

#### 4.2 Teste de patogenicidade dos isolados de *Fusarium* spp.

Os testes de patogenicidade foram realizados em mudas da cultivar susceptível Cícero. Para obter a suspensão de esporos, um disco micelial foi transferido para placas de Petri contendo BDA e incubadas por 14 dias a 25°C ( $\pm 2$ ) com fotoperíodo de 12h. Posteriormente, foram adicionados 15 mL de água destilada esterilizada nas placas e os conídios foram suspensos com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze, quantificada e ajustada para  $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>.

As mudas foram produzidas em bandejas contendo substrato na proporção de 1:1 do substrato comercial Vivatto Plus e areia. Aos 7 dias após a semeadura foram lavadas em água, feito um corte com tesoura nas raízes e imersão na suspensão de esporos por 5 minutos. As mudas utilizadas como testemunhas foram imersas em água destilada esterilizada. Em seguida, duas mudas foram transferidas para cada vaso com capacidade de 0,8 L preenchidos com uma mistura de solo e areia autoclavada na proporção 1:1 e mantidos em casa de vegetação. Para cada isolado foram feitas seis repetições.

O experimento foi mantido durante 6 semanas e após isso as plantas foram retiradas e avaliadas quanto a presença ou ausência dos sintomas das doenças. Para comprovação dos postulados de Koch foram feitos os re – isolamentos de cada um dos fungos inoculados utilizando a metodologia descrita anteriormente.

### 4.3 Caracterização morfológica dos isolados

A caracterização morfológica dos isolados foi baseada nas características culturais e de estruturas reprodutivas do fungo, conforme protocolo descrito por LESLIE & SUMMERELL (2006). Para isso, um disco micelial foi transferido para o centro de uma placa Petri contendo fragmentos de folha de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) sobre meio de cultura *Synthetic low nutriente agar* (SNA). Em seguida as placas foram mantidas em câmara incubadora a 20 °C com fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente + luz negra por 10 –14 dias. Após esse período, amostras de cada isolado foram depositadas entre lâmina e lamínula contendo lactoglicerol para avaliação das estruturas reprodutivas. As dimensões, forma, septação e origem de macro e microconídios, tipos de células conidiogênicas, presença de falsas cabeças, esporodóquios e clamidóporos foram avaliadas com auxílio de microscópio de luz Leica DM 2500 com câmera acoplada Leica DFC 490 em um computador com o programa LeicaQwin –Plus. Para cada característica avaliada foi realizada a medição 30 vezes quando possível.

A avaliação da taxa de crescimento micelial foi feita a partir da transferência de um disco micelial para o centro de placas de Petri contendo BDA, que foram incubadas no escuro em câmara incubadora a 25 °C. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas por 4 dias, por meio da medição do diâmetro ortogonal das culturas em triplicata. As características culturais como pigmentação e tipo de micélio aéreo foram avaliadas após a incubação dos isolados em placas Petri contendo BDA mantidas em câmara incubadora a 20 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente + luz negra por 14 dias.

### 4.4 Caracterização filogenética dos isolados

#### 4.4.1 Extração do DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, procedeu-se o cultivo dos isolados em placas de Petri contendo meio BDA coberto com papel celofane e incubadas a 25 °C no escuro por 3 dias. Em seguida, o micélio foi coletado com o auxílio de um palito de madeira esterilizado e transferido para tubos de 1,5 mL contendo 30 µL de tampão Tris-EDTA (TE). A extração foi realizada com o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit), conforme protocolo adaptado por PINHO et al., (2012). As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

#### 4.4.2 Amplificação do DNA

A amplificação de uma região parcial da segunda subunidade maior da RNA polimerase II dependente de DNA (*Rpb2*) foi realizada com os iniciadores 5F2 (GGGGWGAYCAGAAGAAGGC) e 7cR: (CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT), descritos por SUNG et al., (2007) e LIU et al., (1999), respectivamente. As reações foram conduzidas com DNA diluído 100 × em água ultrapura, 2,5 µL de tampão de reação 5x (GE Healthcare Life Sciences), 1 µL de cada primer a 10 µM (Forward e Reverse), 0,5 µM de dNTPs, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM e 0,25 µL de DNA Polimerase (GE Healthcare Life Sciences) em um volume final de 25 µL. A reação foi feita em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30s e 72 °C por 1 min; finalizando com um passo de 72 °C por 5 min.

Em seguida, os produtos de PCR foram purificados a partir de bandas de gel de agarose a 1% com o Agarose Gel Extraction Kit (Cellco Biotec), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram quantificadas no equipamento Nanodrop® (ND 1000 UV-Vis - Thermo Fisher Scientific), seguido do ajuste para 20 ng/µL e o sequenciamento foi realizado pela Universidade Católica de Brasília - UCB com o uso do sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems).

#### 4.4.3 Análise filogenética

Os eletroferogramas obtidos neste estudo foram visualizados e editados com o software DNA Dragon ([www.sequentix.de](http://www.sequentix.de)) e as posições ambíguas foram corrigidas manualmente através da comparação da sequência senso e anti-senso. Após a correção e obtenção da sequência consenso foi feita a identificação prévia em comparação com sequências de outros isolados de *Fusarium* depositados no banco de dados Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org>). Com base nestes resultados, procedeu-se a análise filogenética separadamente para cada complexo encontrado. Para isso, foram obtidas sequências de referências das espécies dos complexos *F. oxysporum* (Anexo 1) e *F. solani* (Anexo 2) a partir do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

As sequências foram alinhadas utilizando o software MUSCLE (EDGAR, 2004), implementado no programa MEGA®7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR

et al., 2016). A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada empregando o método da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC (POSADA & BUCKLEY, 2004). Para a seleção do modelo de substituição de nucleotídeos para análise de IB foi utilizando o programa MrMODELTEST® 2.3 (Posada e Buckley, 2004). Em seguida, os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo foi selecionado de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC).

A conclusão da análise de IB foi realizada com MrBayes® (RANNALA & YANG, 1996; RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) no CIPRES Science Gateway V. 3.3 (<http://www.phylo.org/>). As árvores iniciaram aleatoriamente até 10.000.000 de gerações e foram amostradas a cada 1.000 gerações, resultando em 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior foram determinados da árvore consenso através das 7.500 árvores remanescentes (RANNALA & YANG, 1996). A árvore foi visualizada no software FigTree® (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos. A espécie *Fusarium foetens* foi utilizada como grupo externo para a análise filogenética entre os fungos do complexo *F. oxysporum* e entre os fungos do complexo *F. solani* foi utilizado *Fusarium staphyleae*.

#### 4.5 Expressão de genes de defesa em plantas de grão de bico tratadas com Extrato de *Rhizobium tropici* (ERT)

##### 4.5.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal empregado no estudo foi proveniente de raízes de plantas de grão de bico da cultivar Cícero. As sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e enxaguadas com água destilada. Em seguida, foram semeadas em copos plásticos de 200 mL perfurados lateralmente e na parte inferior, contendo o substrato comercial Vivatto Plus e cultivadas por 15 dias em casa de vegetação.

A coleta foi realizada em 24 e 48 horas após a aplicação de 1 mL ERT a 1% a uma profundidade de 2 cm no solo próximo ao colo das plantas e as testemunhas foram tratadas com 1 mL de água destilada. Para cada condição fez-se três réplicas biológicas independentes e cada uma destas foi formada por um *pool* de três plantas, que foram analisadas em triplicatas técnicas na análise de RT-qPCR. Após a coleta e lavagem em água corrente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente preservadas a -80 °C.

#### 4.5.2 Seleção dos genes envolvidos na indução de resistência e desenho dos iniciadores

Os genes para o presente estudo foram selecionados a partir de revisões de literatura, levando em consideração os autores UPASANI et al., (2017) que relataram genes envolvidos no sistema de defesa do grão de bico e para a normalização dos dados foram selecionados genes constitutivos conforme REDDY et al., (2016). O desenho dos primers foi realizado na plataforma Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), utilizando os seguintes parâmetros: fragmento amplificado (*amplicon*) com tamanho em pares de base (pb) entre 80 – 110, tamanho dos primers entre 19 – 22 pb, temperatura de dissociação ( $T_m$ ) entre 55 – 62°C e porcentagem de 45 – 55% de Guanina e Citosina (Tabela 2). A ausência de amplificação e produtos inespecíficos foi avaliada utilizando o software OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). A avaliação da especificidade de amplificação dos primers foi realizada através da ferramenta PrimerBlast do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

**Tabela 2.** Genes de defesa e referências usados para análise de RT-qPCR

Gene	Descrição	Acesso	Sequência do Primer 5'-3' F/R	Tamanho do Amplicon (bp)	Eficiência da qPCR
<i>CAT 4</i>	<i>Catalase 4</i>	XM 004500820.3	F- TCCTGCTAATGCTCCCAAGT R- GACCTCTTCATCCCTGTGGA	82	84,85
<i>DEF 1</i>	<i>Defensin-like protein 1</i>	XM 004502958.3	F- ATCACTTGCCCTGCTCATCT R- ACGCACACACTCTTCCCTCT	83	84,96
<i>DOX 1</i>	<i>Alpha-dioxygenase 1</i>	XM 004489251.3	F- GCAAGTCAATGCCCACTAA R- ATGTTTGCTGCTCCAGTCCT	92	85,34
<i>PAL 2</i>	<i>Phenylalanine ammonia-lyase 2</i>	XM 027333119.1	F- GAAACGCATGGTGGAAGAGT R- CCGCAGCCACTTGAGATATT	80	84,3
<i>LOX 1</i>	<i>Linoleate 9S-lipoxygenase</i>	XM 004510355.3	F- TGATGGTGAATCGGCACTTA R- ACCAGCAATCATCTCCCTTG	103	89,02
<i>PER 10</i>	<i>Peroxidase 10</i>	XM 004511903.2	F- TTTTGGGCTGTACCTCTTGG R- TTCAAAGGGTGATGGCAAGT	81	93,79
<i>CHIT 1</i>	<i>Class I chitinase</i>	NM 001278977.1	F- TGACTATTGCGGTGATGGTT R- TCAGCATCTGGTTGAAGGTG	95	92,11
<i>SP41A</i>	<i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase</i>	NM 001364754.1	F- TCTTTTCACCTCCCCAAATG R- CGCATGTACCGAATCCAAC	88	87,76
<i>G6PD*</i>	<i>Glucose-6-Phosphate dehydrogenase 1-</i>	XM 004489522.3	F- TCCCCTGAACAGTTGGAGAT R- CAAACGGAAATCGTCCTCAG	90	86,55
<i>GAPDH*</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase</i>	NM 001365164.1	F- CGTGTCCCAACTGTTGATGT R- CCTCCTTGATAGCAGCCTTG	94	84,14
<i>UCP*</i>	<i>Uncharacterized conserved protein</i>	XM 004505589.3	F- CGCTTCTGGAGGGACTTCTA R- CTTGTTGGGGTGTCAATTCC	91	85,17
<i>VPS*</i>	<i>Vacuolar protein sorting</i>	XM 004486353.3	F- ACCGCTGTTGGACTTGTAGC R- AATGCTAGGAACCGCTTGAA	101	85,77

#### 4.6.3 Extração do RNA total de plantas de grão de bico

As extrações de RNA total foram feitas de tecidos radiculares com o uso do reagente Pure link plant RNA reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Foi adicionado 0,5 mL do reagente para 0,3 g de cada amostra de tecido vegetal macerado com uso de nitrogênio líquido em almofariz e levadas ao homogeneizador do tipo vortex por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram mantidos no gelo durante cinco minutos para a dissociação completa das nucleoproteínas, centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm à 4 °C e o sobrenadante transferido para outro tubo de 1,5 mL. Logo após, foram adicionados 100 µL de NaCl a 5 M e 300 µL de clorofórmio, e os tubos foram homogeneizados por um minuto e centrifugados por 30 minutos a 12.000 rpm à 4 °C.

Em seguida, a fase superior aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo e adicionado isopropanol na proporção de 1:1. As amostras foram incubadas por 30 minutos a -20 °C e centrifugadas a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 1 mL de etanol 75%. O *precipitado* foi seco por 20 minutos à temperatura ambiente e eluído em 200 µL de água ultrapura.

Para cada amostra de RNA foi realizada uma nova extração utilizando Trizol. Foi adicionado 0,5 mL do reagente e 1% de β-mercaptoetanol e homogeneizado em vortex por 1 minuto. As amostras foram mantidas no gelo por 5 minutos e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos à 4 °C. Em seguida, foram adicionados 300 µL de clorofórmio, seguido de homogeneização por 1 minuto em vortex e centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

A fase aquosa foi coletada e foi adicionado isopropanol na proporção de 1:1 e 1:10 de acetato de sódio a 3 M e pH 5. As amostras foram incubadas por 30 minutos a -20 °C e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em 1 mL de etanol 75%. O precipitado foi seco por 20 minutos à temperatura ambiente, eluído em 20 µL de H<sub>2</sub>O RNase free. A avaliação quantitativa foi feita em Nanodrop® (ND 1000 UV-Vis - Thermo Fisher Scientific) e a qualidade por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%.

#### 4.5.4 Tratamento das amostras com DNase

Para evitar a contaminação por DNA genômico durante as análises de RT-qPCR, as amostras foram submetidas ao tratamento com desoxirribonuclease (DNase). Para isso, foi utilizado 2 µg de RNA, 2 µL de tampão 10 × e 0,2 µL da enzima Turbo DNase (Invitrogen) em 20 µL de volume final completados com água ultrapura. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 30 minutos e em seguida a enzima foi inativada através da adição de 1 µL de EDTA 25 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético) e desnaturação a 65°C por 10 min.

Após o tratamento com a enzima DNase, a integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1 %. Além disso, a PCR quantitativa foi utilizada para confirmação da ausência de DNA genômico. Em cada reação foi utilizado 0,5 µL de RNA tratado, 0,2 µL de cada primer (Forward e Reverse) e 5 µL de SYBR ® Green Master Mix (Applied Biosystems) em volume final de 10 µL completados com água ultrapura.

#### **4.5.5 Síntese do DNA complementar (cDNA)**

A síntese do DNA complementar foi feita com o kit Next Generation MMLV RNase H Minus First-Strand cDNA Synthesis (DNA Express Biotecnologia LTDA). Cada reação foi composta de 10 µL de RNA tratado, 1 µL de oligo (dT), 1 µL de dNTP's, seguida de incubação à 65°C por 5 min e no gelo por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de Tampão de Reação 5X First-Strand cDNA, 2 µL de DTT (Ditiotreitol) e 1 µL da enzima Next Generation Transcriptase Reversa M-MLV RNase Minus. A transcriptase reversa (RT) foi feita com incubação a 50 °C por 60 min e a inativação da enzima a 70 °C por 15 min. O cDNA foi armazenado a -20 °C para uso posterior.

#### **4.5.6 Validação dos iniciadores e do cDNA**

A validação dos primers bem como dos cDNA foi feita através da RT-PCR semi-quantitativa. As reações foram conduzidas com cDNA diluído 10 × em água ultrapura, 2,5 µL de tampão de reação 5 × (GE Healthcare Life Sciences), 1 µM de cada primer a 10 mM (Forward e Reverse), 0,5 µM de dNTPs, 0,75 de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM e 0,25 µL de DNA Polimerase (GE Healthcare Life Sciences) em um volume final de 25 µL. A reação foi feita em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30s e 72 °C por 1 min;

finalizando com um passo de 72 °C por 5 min. A visualização dos produtos de amplificação foi feita em gel de agarose 1% após coloração com brometo de etídio.

#### **4.5.7 Análise da expressão gênica por RT-qPCR**

Os experimentos de qPCR foram realizados em placas de 96 poços em termociclador 7300 96-well Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Cada reação foi composta por 5 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2 µL de cada primer (Forward e Reverse) e 2 µL de cDNA (diluído 10 ×) referente a cada amostra analisada. O programa de PCR utilizado foi um ciclo a 95 °C por 10 min para ativação da enzima Taq DNA polimerase (hot start), 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s repetidos por 40 ciclos. A curva de desnaturação - “melting curve” - foi analisada ao término da reação para a verificação da presença de dímeros de primers e produtos inespecíficos. Controles negativos (sem a presença de cDNA) também foram avaliados para confirmar a ausência de contaminação com DNA.

#### **4.5.8 Análise dos dados**

Os dados brutos da fluorescência de todas as corridas foram importados para o software Real-time PCR Miner, para a determinação da eficiência da PCR (ZHAO & FERNALD, 2005). O software Real-time PCR Miner baseia-se na cinética individual das reações de PCR e determina a eficiência de reação, sem a necessidade de uma curva padrão, utilizando os pontos iniciais e finais da fase exponencial da PCR, para estimar a eficiência da reação para cada amostra/gene. Em seguida, foi calculada a média e o coeficiente da variação da eficiência para cada gene e a expressão gênica foi analisada pelo software Rest (PFAFFL et al., 2017). Os valores de Cq da triplicata biológica e o valor da eficiência de cada gene foram gerados pelo software Real Time PCR Miner para determinar a expressão relativa dos genes alvos. A normalização foi realizada com a utilização de genes de referências. Os valores de Cq, obtidos pelo software Real time PCR Miner, foram convertidos em quantidade relativa não normalizada pelo software REST, as quais foram importadas para o software geNorm para classificar os melhores genes referência. Após a determinação dos genes normalizadores pelo software geNorm foi feita a análise da expressão relativa de cada gene candidato comparando as amostras de plantas testemunhas (tratadas com água) com 24 h e de plantas testemunhas (tratadas com água) com 48 h.

Os valores de Cq foram submetidos ao software Rest, onde foi informada a eficiência dos primers, os genes normalizadores e as amostras controle. Na análise da expressão relativa de cada gene, o controle utilizado foi plantas testemunhas (tratadas com água). Para determinar as expressões relativas foi realizada análise estatística ( $p \leq 0,05$ ). A expressão relativa dos genes foi considerada diminuída, aumentada ou não estatisticamente válida, sendo considerado um *Fold Change*  $\leq 0,5$  e  $\geq 1,5$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Teste de patogenicidade

Os resultados dos testes de patogenicidade através do método de ferimento de raiz, demonstraram suscetibilidade das plantas de grão de bico da cultivar Cicero, o que evidencia a capacidade patogênica dos isolados de *Fusarium*. Os sintomas aparentes nas plantas foram visíveis a partir da terceira semana após a inoculação com o patógeno. Todos os isolados provocaram murcha e amarelecimento (Figura 2a), além de produzir sintomas de escurecimento do sistema vascular (Figura 3a) e externo as raízes (Figura 4a). As plantas testemunhas não apresentaram sintomas da doença (Figuras 2b, 3b e 4b).

Em relação as características sintomáticas, observou-se amarelecimento progressivo, com início nas folhas mais velhas para as mais jovens e o progresso da doença resultou em clorose. A murcha foi observada tardia, entre a quinta e sexta semana e não houve queda foliar. As plantas conseguiram produzir vagens, mesmo sob estresse pelo patógeno. O re – isolamento do fungo a partir de tecidos infectados comprovou a patogenicidade após a comparação das características morfológicas, completando os postulados de Koch.



**Figura 2.** Sintomas induzidos por *Fusarium oxysporum* em plantas de grão de bico A) murcha e amarelecimento B) Plantas sadias, não inoculadas.



**Figura 3.** Sintomas induzidos por *Fusarium oxysporum* em planta de grão de bico A) Descoloração do sistema vascular B) Sistema vascular sadio, planta não inoculada.



**Figura 4.** Sintomas induzidos por *Fusarium falciforme* em planta de grão de bico. A) Podridão radicular. B) Sistema radicular sadio, planta não inoculada.

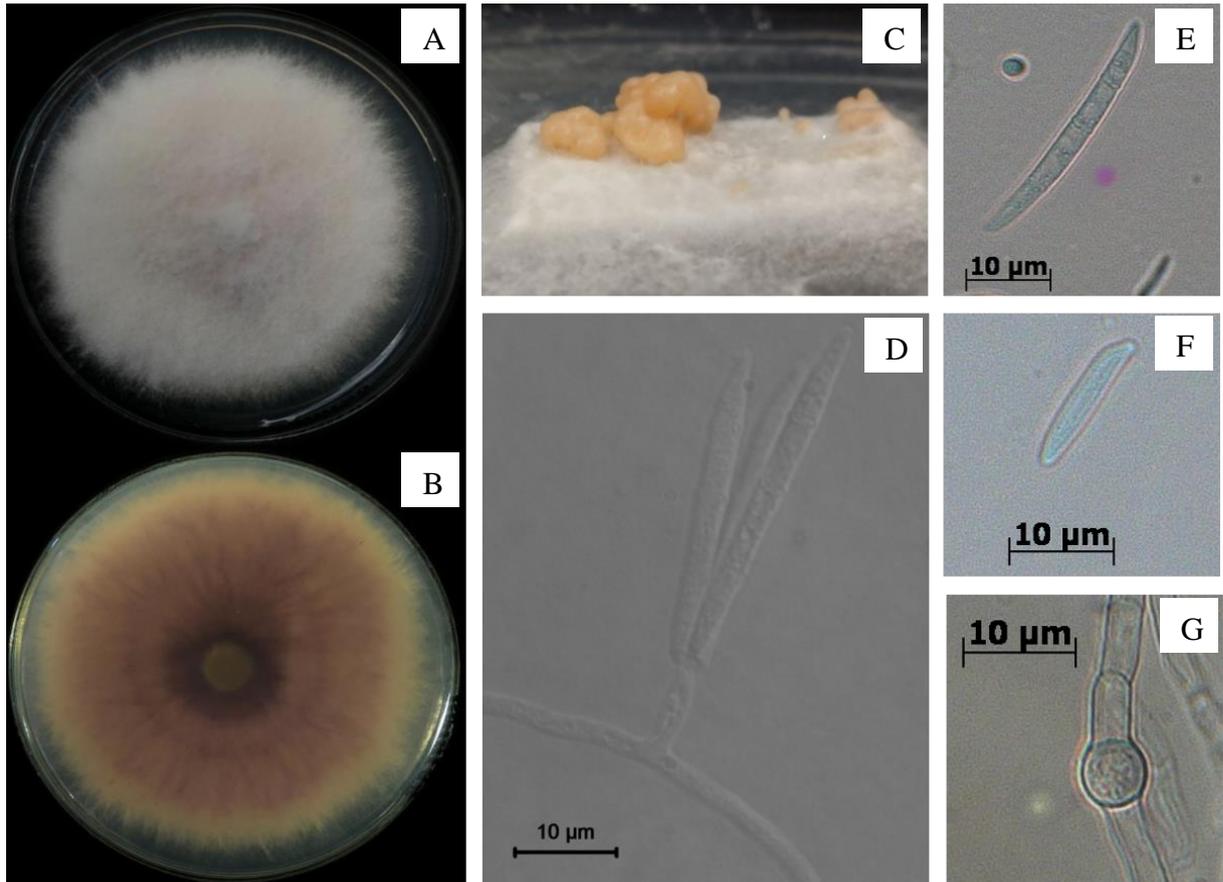
## 5.2 Caracterização cultural e morfológica dos isolados de *Fusarium* spp.

Os 24 isolados de *Fusarium* obtidos de diferentes localidades foram preservados na Coleção de Culturas da Universidade de Brasília (CCUB) e destes procedeu-se a caracterização de 19 isolados, que devidamente nomeados com o nome da coleção de culturas + número do espécime (Tabela 3). A maioria dos isolados avaliados apresentaram características morfológicas e culturais típicas do complexo de espécies *F. oxysporum* (FOSC), conforme LESLIE & SUMMERELL, (2006). Os isolados deste complexo de espécies, apresentaram características culturais variáveis, com micélio aéreo ralo ou cotonoso, apresentando pigmentação branca, exceto para os isolados CCUB 2289 e CCUB 2284 que apresentaram pigmentação vinácea. Em relação a pigmentação do verso da colônia houve variação entre creme, púrpura, púrpura pálido ou vinácea. A taxa média de crescimento micelial dos isolados nos quatro dias avaliados variou de 12,8 a 19 mm/d.

**Tabela 3.** Características culturais e morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp.

Código (CCUB)	Origem geográfica	Pigmentação da cultura (frente/verso)	Taxa de crescimento radial (mm)	Macroconídios		Microconídios	
				Comp/larg. (µm)	Septos	Comp/larg. (µm)	Septos
<i>F. oxysporum</i>							
2276	Brasília - DF	Branco/Púrpura pálido	12,8	13,2-17,2 x 2,0-3,2	3-4	4,85-9 x 1,55-3,95	0-1
2278	Brasília - DF	Branco/ Púrpura pálido	13,8	11-15 x 2,5-4	3-4	5-8 x 1,5-4	0-1
2279	Goianésia - GO	Branco/Vinácea	16,8	24-58 x 3,2-3,5	3-4	7-15 x 2-4	0-1
2280	São João d' Aliança- GO	Púrpura/Vinácea	17,2	10-31,5 x 3,1-4,4	3-4	6-8 x 2-3,2	0-1
2282	Cristalina - GO	Branco/ Vinácea	15,6	19-50 x 3,1-5,6	3-6	5,6-10 x 1,35-2,9	0-1
2283	Posse – GO	Branco/Laranja pálido	16,2	11,6-18 x 2-3,3	3-7	5,1-10 x 1,35-3,3	0-1
2284	Posse – GO	Vinácea/Vinácea	15,4	25,8-40 x 2,8-4,1	3-7	5,2-8,6 x 1,5-2,8	0-1
2285	Posse – GO	Branco/Púrpura pálido	15,2	15,5-37,15 x 1,8-3,6	3-7	5-8,9 x 1,0-3,35	0-1
2286	Posse – GO	Branco/Púrpura pálido	14,2	23,8-49 x 2,5-4,65	3-7	6,25-17,55 x 2-4	0-1
2287	Posse – GO	Branco/Púrpura pálido	16,8	18,6-43,5 x 2,7-4,5	3-7	7,2-15,9 x 2,2-3,5	0-1
2288	Posse – GO	Branco/Vinacea	18,4	16,3-44,6 x 2,5-3,6	3-7	4,6-7,0 x 1,8-2,8	0-1
2289	Cristalina - GO	Vinácea/Vinácea	16,6	18,7-46,3 x 2,7-4,4	3-6	7,5-13,2 x 1,8-3,3	0-1
2293	Cristalina - GO	Branco/Creme	17,4	32,7-63,7 x 2,4-4,4	3-6	6-12,1 x 1,25-3,85	0-1
2297	Cristalina - GO	Branco/Creme	13,2	12,7-16,7 x 2,3-3,3	3-6	5,45-10,4 x 1,95-3,9	0-1
2298	Cristalina - GO	Branco/Laranja pálido	15	11-20,85 x 2,6-4,35	3-6	5,7-9,1 x 1,9-3,5	0-1
2299	Cristalina - GO	Branco/Laranja pálido	19	14,8-30,15 x 2,5-4,6	3-6	5,65-11,8 x 2-5,3	0-1
<i>F. solani</i>							
2277	Brasília – DF	Branco/Creme	12,2	20,7-33,9 x 3,35-5,5	3-4	9,68-17,6 x 2,5-5,3	0-2
2281	São João d' Aliança- GO	Branco/Creme	14,6	17,4-35,4 x 3-5,2	3-4	7,1-11,2 x 2,2-4	0-2
2290	Posse – GO	Branco/Creme	15,8	16,9-28,65 x 3,7-5,78	3-5	10-15,5 x 2,5-4,9	0-2

Os macroconídios foram produzidos em monofiálides simples e curtas, e para alguns isolados formados em esporodóquios com pigmentação creme. O formato observado foi falcado a quase reto, com célula apical curvada em formato de gancho e célula basal em forma de pé (nem sempre evidente em todos os isolados) (Figura 5). O número de septos variou de 3 a 6 e o tamanho de 10 – 63,7 x 1,8 – 4,65  $\mu\text{m}$  e os septos de 3 – 6.

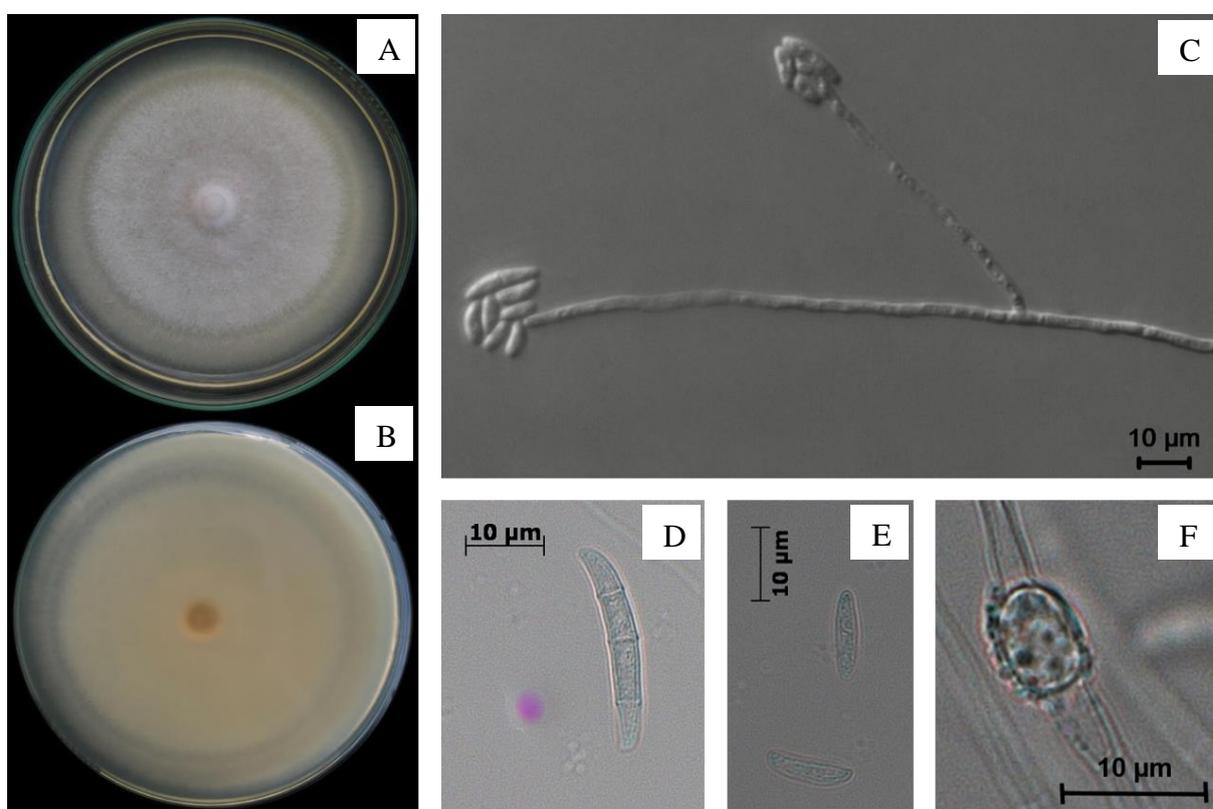


**Figura 5.** Características morfológicas e culturais dos isolados de *F. oxysporum*. A) superfície da colônia. B) Verso da colônia. C) Esporodóquios formados na superfície da folha de cravo. D) Macroconídios produzidos em fiálides curtas. E) Macroconídios. F) Microconídios. G) Clamidósporo intercelular.

Os isolados produziram microconídios em falsas cabeças, com 0 – 1 septo de formato oval ou elipsoidal. Os isolados CCUB 2286 e CCUB 2287 produziram microconídios maiores em relação aos outros isolados (Tabela 3). A maioria dos isolados produziram clamidósporos com característica intercalar e aspecto liso, com exceção dos isolados CCUB 2276, CCUB 2279, CCUB 2280, CCUB 2288, CCUB 2298 e CCUB 2299 que apresentaram clamidósporos lisos, intercalares e terminais. Apenas o isolado CCUB 2284 produziu clamidósporos na

avaliação aos 21 dias de cultivo em meio de cultura SNA + folha de cravo, os demais isolados apresentaram clamidósporos após 30 dias.

Em relação aos isolados com características semelhantes ao complexo de espécies *F. solani*, foi observado na superfície da colônia pigmentação branca e no verso creme (Figura 6). Os isolado CCUB 2277 produziu micélio cotonoso, enquanto os isolados CCUB 2281 e CCUB 2290 apresentaram micélio aéreo esparsos arranjados em anéis concêntricos. A taxa média de crescimento micelial dos isolados de FSSC foi menor em relação aos FOSSC e variou entre 12,2 – 15,8 mm/d.



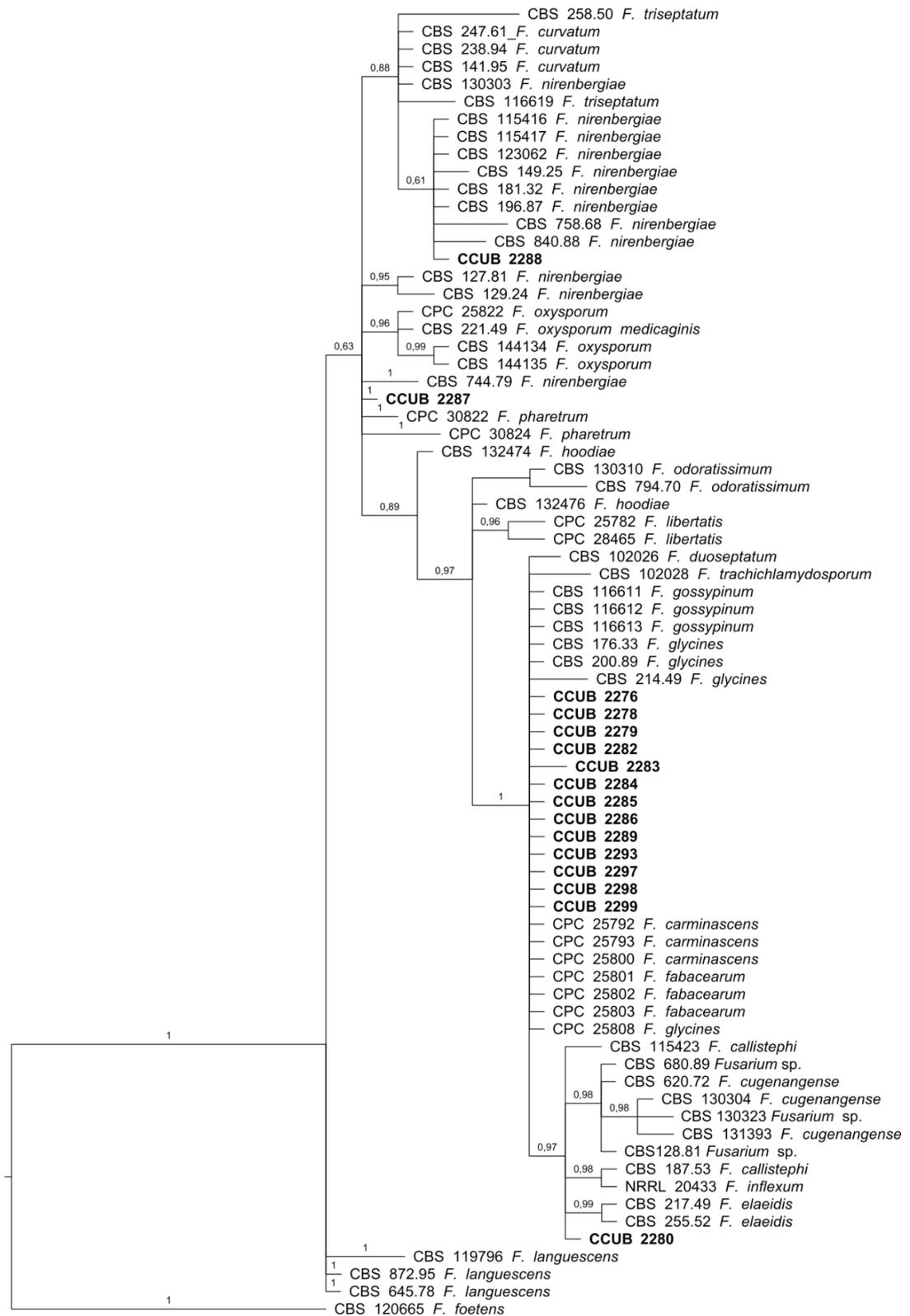
**Figura 6.** Características morfológicas dos isolados de FSSC. A) superfície da colônia. B) Verso da colônia. C) Falsas cabeças formadas em conidióforo. D) Macroconídio. E) Microconídios. F) Clamidósporo intercelular.

As características morfológicas variaram pouco entre os isolados de FSSC e não foi observado a presença de esporodóquios. Os macroconídios apresentaram tamanho variado com 3 – 5 septos, formato oval, falcado ou reniformes. Os microconídios foram produzidos em falsas cabeças e apresentaram formato oval, cilíndrico ou reniformes, com 0 – 2 septos.

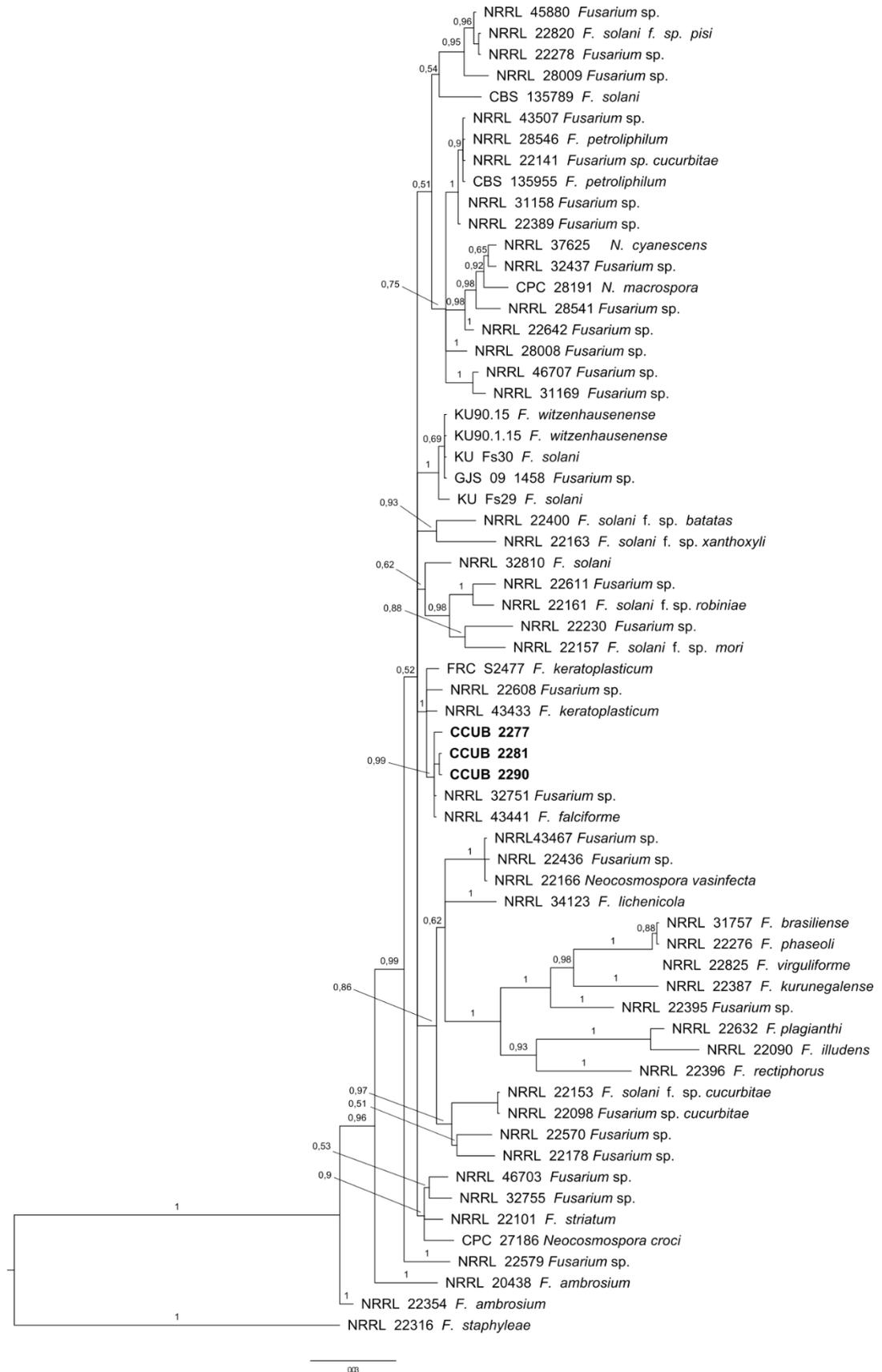
### 5.3 Caracterização filogenética de *Fusarium* spp.

A comparação das sequências consenso de uma região parcial do gene *Rpb2* de cada isolado com o banco de dados Fusarium ID mostrou a presença de 16 isolados pertencentes ao complexo de espécies *F. oxysporum* e três isolados pertencentes ao complexo de espécies *F. solani*. As sequências de *Rpb2* dos 16 isolados do complexo de espécies *F. oxysporum* juntamente com as sequências de referência dos isolados do Genbank, após alinhadas resultou em uma matriz contendo 877 sítios, dos quais 25 possuem informações parcimoniosas, 70 sítios variáveis e 807 sítios conservados. O modelo de substituição de nucleotídeo selecionado foi K80+I. Já as sequências dos três isolados do complexo de espécie *F. solani* juntamente com as sequências obtidas do Genbank após alinhadas, resultou em uma matriz de 863 e destes, 186 possuem informações parcimoniosa, 259 são sítios variáveis e 604 são conservados. O modelo de substituição de nucleotídeos selecionados foi o SYM+I+G.

Treze dos isolados de FOOSC agruparam com os isolados de *Fusarium gossypinum*, *Fusarium duoseptatum*, *Fusarium trachichlamydosporum*, *Fusarium glycines*, *Fusarium carminascens*, *Fusarium fabacearum* e *F. oxysporum* com suporte de 1 (Figura 7). O isolado CCUB 2280 agrupou em outro clado, próximo a *Fusarium elaeidis*, *F. inflexum*, *F. callistephi* e *F. cugenangense* com alto valor de suporte. O isolado CCUB 2288 agrupou em um clado que possui *F. nirenbergiae* com valor de probabilidade posterior de 0.61. O isolado CCUB 2287 foi identificado apenas dentro do complexo de espécies de *F. oxysporum* por não agrupar com outras espécies. Os três isolados de *F. solani* agruparam com a espécie *F. falciforme*, presente no clado 3 do complexo de espécies, com alto valor de suporte (Figura 8).



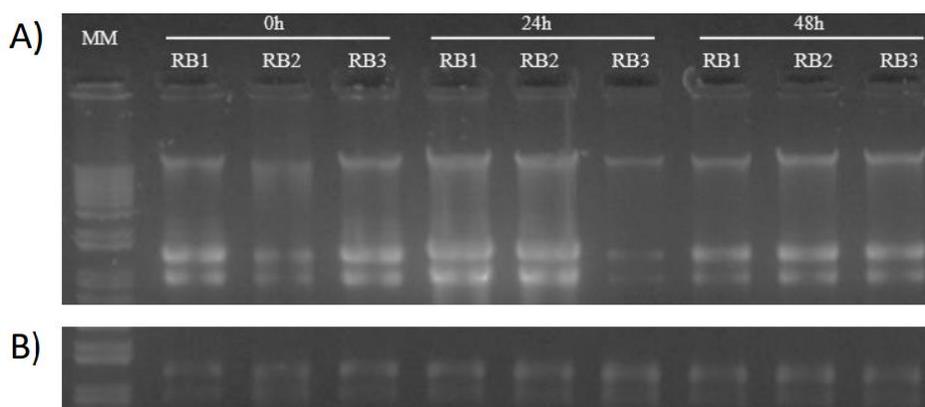
**Figura 7.** Filograma dos isolados do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* obtido por meio de Inferência Bayesiana com base em sequências de *Rpb2*. A árvore foi enraizada com *Fusarium foetens*.



**Figura 8.** Filograma dos isolados do complexo de espécies *Fusarium solani* obtido Inferência Bayesiana com base em sequências de *Rpb2*. A árvore foi enraizada com *Fusarium staphyleae*.

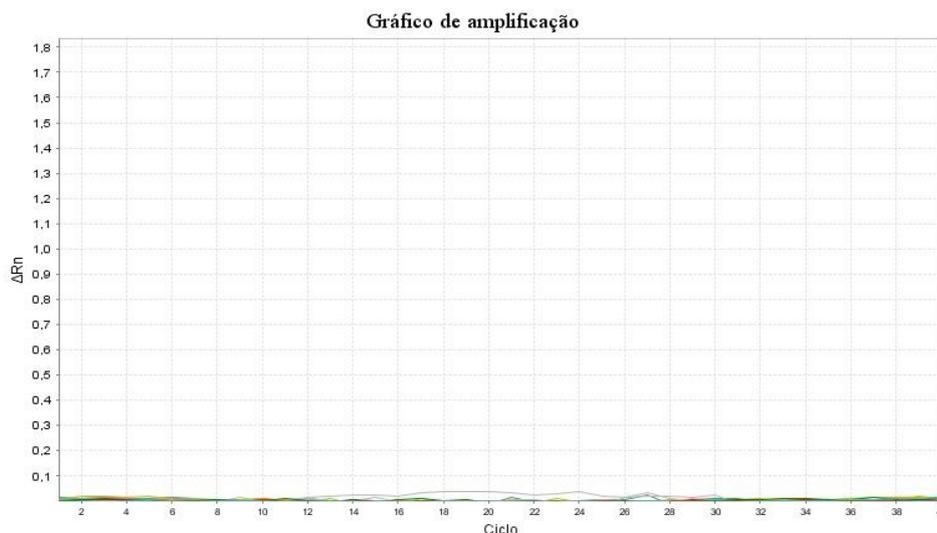
#### 5.4 Expressão de genes de defesa em grão de bico com uso de ERT por meio de RT-qPCR

A extração de RNA total das raízes de grão de bico utilizando o reagente Concert, seguido com o método TRizol possibilitou a obtenção de amostras integras e puras, com valores de  $A_{260/280}$  próximos a 2,0 (Figura 9a). Após a purificação as amostras de RNA total foram submetidas ao tratamento com DNase e as amostras mantiveram-se integras para posterior uso na síntese de cDNA (Figura 9b).



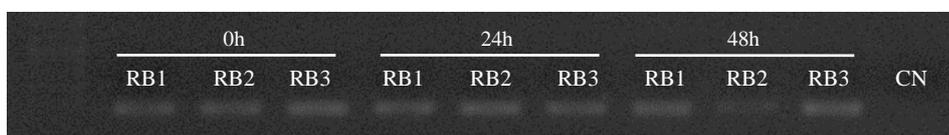
**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose A) RNA total das amostras de raízes de grão de bico. B) Amostras de RNA total tratadas com 0,2  $\mu$ L da enzima DNase. A figura mostra os tempos 0h (plantas testemunha), 24 h e 48 h após o tratamento com ERT analisados e as respectivas réplicas biológicas (RB).

Após a análise de qPCR das amostras de RNA tratadas com a enzima DNase, os resultados mostraram que não houve amplificação, confirmando a ausência da contaminação por DNA genômico, que possibilitou o uso do RNA para a síntese de cDNA (Figura 10).



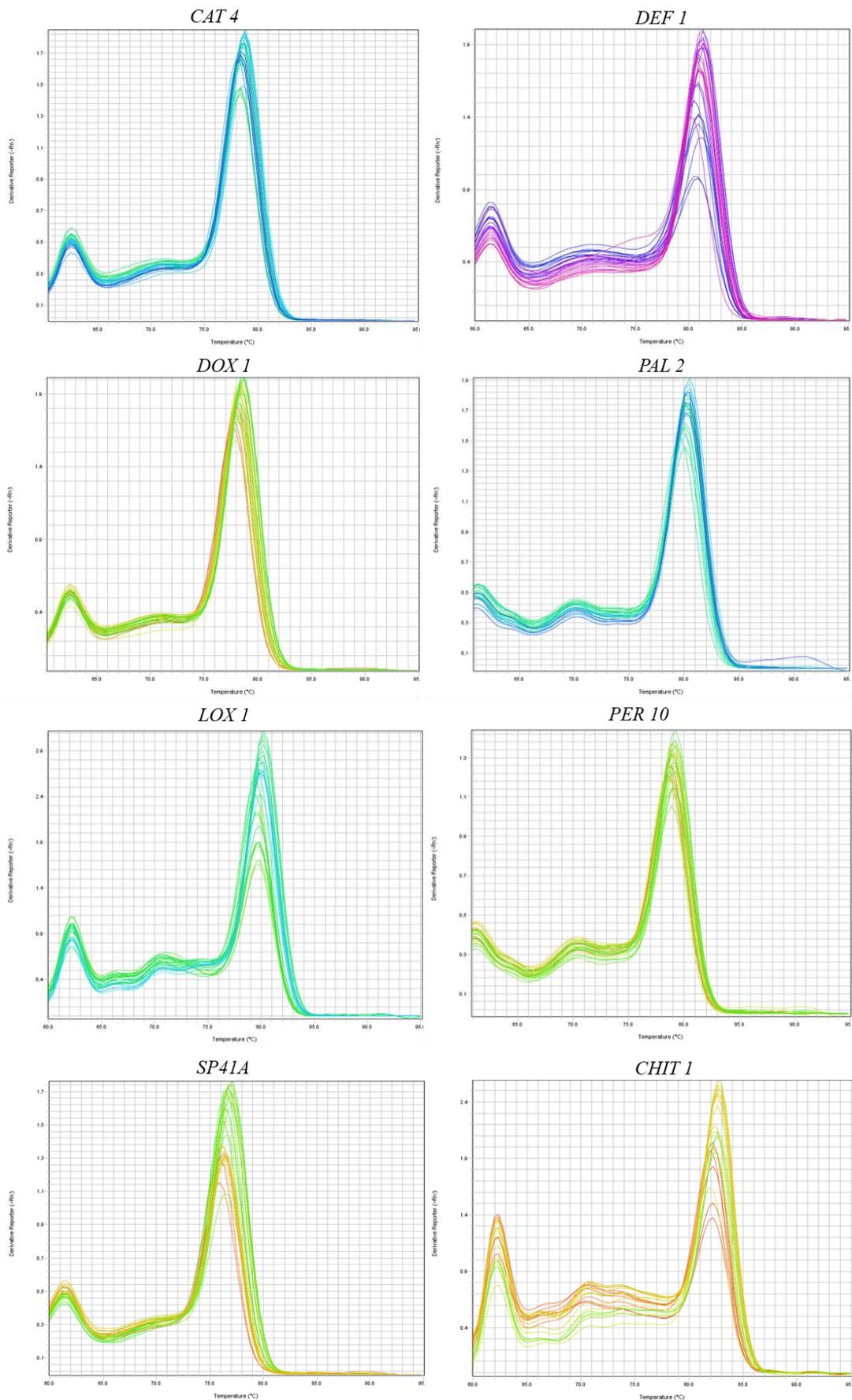
**Figura 10.** Gráfico mostrando ausência de amplificação das amostras de RNA tratadas com DNase.

Após a síntese do cDNA, as amostras foram submetidas ao teste de amplificação por meio de RT-PCR semi-quantitativa com o primer *CHIT 1* para confirmar a eficiência da síntese de cDNA. Os resultados mostraram a amplificação de fragmentos em conformidade ao tamanho do *amplicon* desejado (Figura 11).



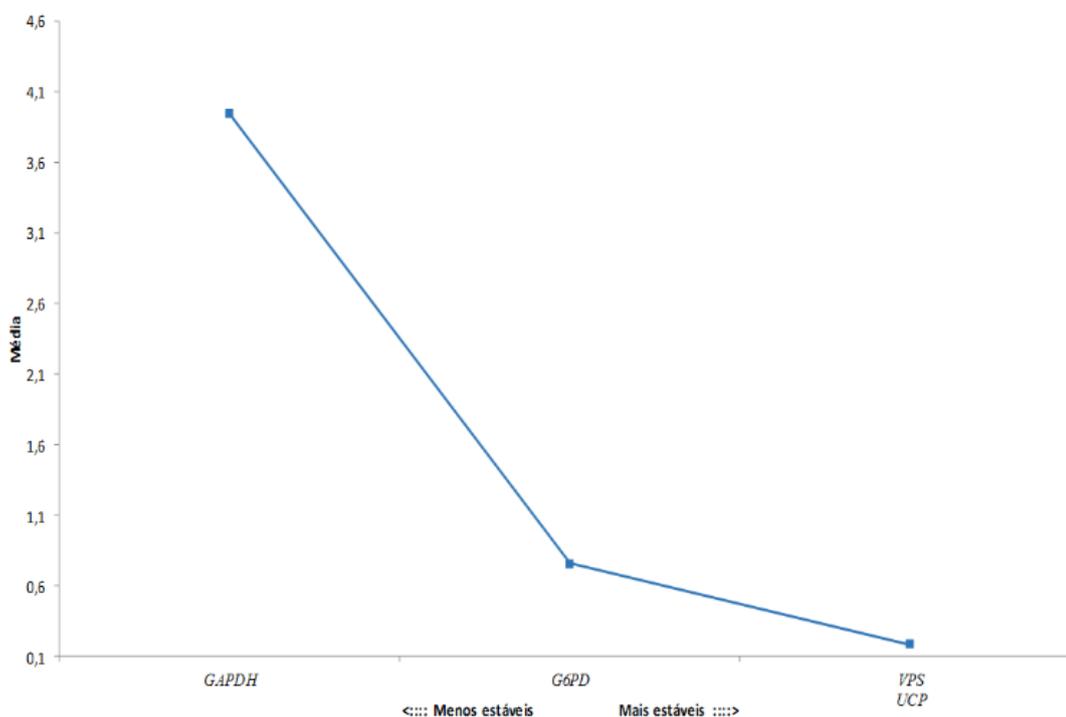
**Figura 11.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação a partir dos cDNAs diluídos em 10x. A figura mostra os tempos 0 h (plantas testemunha), 24 h e 48 h após o tratamento com ERT analisados e as respectivas réplicas biológicas (RB).

Em seguida, foi feita a análise da expressão relativa por RT-qPCR dos 8 genes envolvidos na resposta de defesa do grão de bico a doenças e dos 4 genes referência. Posteriormente, realizou-se a análise das curvas de dissociação (*melting curve*) dos genes candidatos, que indicou a presença de apenas um pico, ou seja, a presença de um único *amplicon*, livre de produtos inespecíficos e dímeros de *primers* (Figura 12). Os valores de eficiência da amplificação para cada *primer* obtidos a partir do software Real-time PCR Miner variaram entre 84,11 - 93,79%.



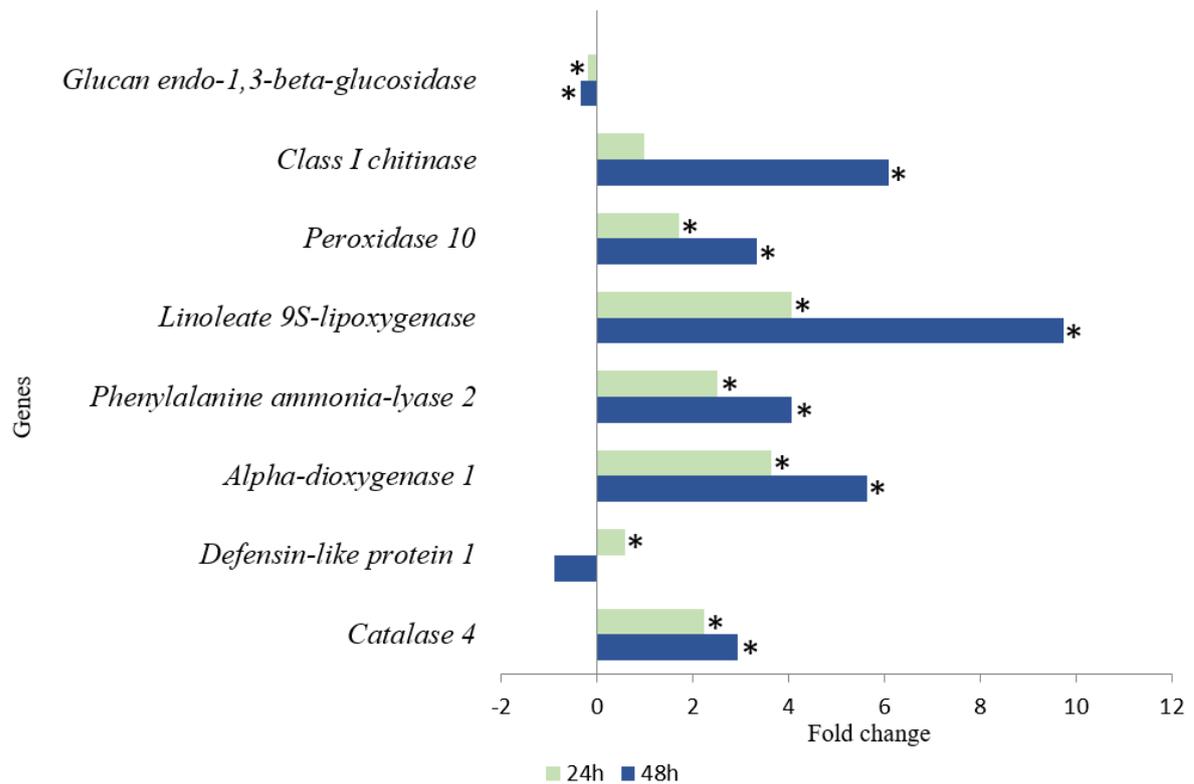
**Figura 12.** Curva de dissociação obtida para cada par de primer dos 8 genes candidatos.

Com a finalidade de selecionar os dois genes de referência mais estáveis para a normalização dos dados, foi realizado um teste no programa geNorm com os quatro genes de referência (Figura 13). Foi observada uma maior estabilidade dos genes VPS, UCP e G6PD quando comparados a GAPDH, apresentando valores de estabilidade abaixo do limiar aceito de 0,5 sugerido pelo programa. Entretanto, apenas VPS e UCP apresentaram valores de estabilidade semelhantes, portanto, os dois genes foram selecionados.



**Figura 13.** Média da estabilidade de expressão dos genes de referência.

Após a seleção dos genes de referência, foi realizada a análise da expressão relativa e os resultados demonstraram que a maioria dos genes analisados foram regulados positivamente nas plantas tratadas com ERT em relação as plantas testemunha (tratadas com água) e apresentaram diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 14). Foi interessante observar que os valores de expressão aumentaram para a maioria dos genes avaliados em 48 h após aplicação de ERT, quando comparado com as plantas testemunha (Anexo 3). Isso pode ser visto para os genes LOX 1 (*Linoleate 9S-lipoxygenase*), PER 10 (*Peroxidase 10*), PAL 2 (*Phenylalanine ammonia-lyase 2*), DOX 1 (*Alpha-dioxygenase 1*) e CAT 4 (*Catalase 4*), que apresentaram regulação positiva em 24 h e aumentaram em 48 h após a aplicação de ERT.



**Figura 14.** Análise da expressão relativa dos genes de defesa em raízes de grão de bico 24 e 48 horas após a aplicação de ERT. As barras que apresentam asterisco (\*) possuem diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) em relação a testemunha (plantas tratadas com água).

O gene CHIT 1 (*Class I chitinase*) apresentou regulação positiva para o tempo de 48 h, entretanto em 24 h não houve diferença estatisticamente significativa em relação as plantas do grupo controle. Em relação ao gene DEF (*Defensin-like protein*) observou-se um padrão de expressão diferente para os demais genes. Em 24 h esse gene foi regulado positivamente, entretanto em 48 h a expressão diferencial não foi estatisticamente significativa. O gene SP41A (*Glucan endo-1,3-beta-glucosidase*) foi o único regulado negativamente com valores significativos para os dois tempos amostrados.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização morfológica dos isolados

A caracterização morfológica de fungos das espécies de *Fusarium* tem sido difícil, devido à ausência de marcadores morfológicos para a diferenciação. Portanto, o uso único da morfologia não é o melhor método para a identificação ao nível de espécies (LESLIE & SUMMERELL, 2006). Por exemplo, a espécie *Fusarium redolens* havia sido identificada anteriormente como a raça 0 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, devido às semelhanças entre as características morfológicas e os sintomas produzidos (BOUHADIDA et al., 2017).

A morfologia pode ser útil para a diferenciação entre os complexos de espécies *F. solani* e *F. oxysporum*, pois cada grupo apresenta características exclusivas, como demonstrado nos resultados deste estudo. As características morfológicas dos fungos do complexo *F. oxysporum* do presente trabalho foram parecidas com as relatadas para esse complexo (LESLIE & SUMMERELL, 2006).

Os isolados de *F. oxysporum* caracterizados por AZEVEDO et al., (2017), apresentaram características semelhantes aos do presente estudo, entretanto, algumas características, como a pigmentação azulada no verso das colônias de alguns dos isolados não foi observada. Além disso, os isolados CCUB 2278, CCUB 2283, CCUB 2297, CCUB 2298 apresentaram macroconídios menores, em comparação aos relatados pelos autores. A taxa de crescimento também foi diferente, apresentando-se mais rápida no presente estudo. A presença e forma dos clamidósporos, bem como o comprimento e largura de microconídios possuem concordância em relação aos isolados deste estudo.

Alguns dos isolados do presente trabalho mostraram semelhança com as características morfológicas dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, que possuem especificidade patogênica ao grão de bico na Índia, apresentando variação de tamanhos máximos e mínimos de macroconídios entre 6,5 – 34,5 x 0,92 – 4,6 µm de comprimento x largura, com 2 – 4 septos. Enquanto, os microconídios apresentam tamanhos de 2,3 – 13,8 x 0,69 – 4,6 µm (MANDHARE et al., 2011).

Os isolados do complexo de espécies *F. solani* apresentaram características culturais e morfológicas semelhantes a *F. falciforme* relatados por CHEHRI et al., (2015), que observaram características de micélio aéreo esparso e arrançando em anéis concêntricos, de coloração superficial branca e verso creme, macroconídios ovais alongados, clavados ou reniformes, apresentando de 3–5 septos e microconídios ovais com 0–2 septos. Os

clamidósporos também possuem conformidade aos observados no presente estudo e possuem características intercalares com aspecto rugoso.

Em comparação com as descrições dos isolados relatados por CABRAL et al., (2016), os isolados deste estudo apresentaram clamidósporos diferentes, sendo que não foi observado clamidósporos bicelulares e terminais já relatados, enquanto as outras características, como tamanho, septação de macro e microconídios apresentaram semelhanças. AZEVEDO et al., (2017) observaram a produção de esporodóquios por isolados FSSC, com pigmentação creme e um padrão de tamanho diferente dos macro e microconídios, entretanto, o formato e o número de septos foram parecidos, além disso, os fungos do presente estudo cresceram mais rapidamente.

## 6.2 Análise filogenética dos isolados de *Fusarium* spp.

Os resultados deste trabalho, bem como os que fazem uso de sequências de DNA a partir de regiões genômicas específicas e conservadas, são fundamentais para a realização correta da identificação do agente causal, no qual reflete na escolha das medidas de controle (XU, 2016). A variação e sobreposição de características morfológicas existente entre espécies de *Fusarium* pode dificultar a identificação e por consequência o manejo (LESLIE & SUMMERELL, 2006). A identificação de espécies de *Fusarium oxysporum* ocorrentes em grão de bico é demonstrada por meio da denominação em raças e *formae speciales*, enquanto que para *Fusarium solani* é relatado *formae speciales* (JIMENEZ-GASCO et al., 2003; ŠIŠI et al., 2018).

Entretanto, GURJAR et al., (2017) mostraram que a denominação de raças para *F. oxysporum* pode omitir a verdadeira identidade genética do patógeno, pois essa denominação é baseada em estudos de cultivares diferenciadoras e técnicas moleculares que não fundamentam em homologia de sequências de DNA. Diante dessas dificuldades taxonômicas em *Fusarium oxysporum*, LOMBARD et al., (2019) fizeram uma epitificação e nomearam 15 espécies, através da análise filogenética concatenada a partir de quatro regiões genômicas (*cmdA*, *rpb2*, *tef1e* *tub2*) e diferenças morfológicas súteis que permitiram diferenciação.

As sequências de DNA parciais do gene *Rpb2* das espécies tipo nomeadas por LOMBARD et al., (2019) foram utilizadas para comparar com as sequências dos isolados pertencentes ao FOOSC do presente estudo. Os resultados da análise filogenética demonstraram que uma única região genômica é insuficiente para a identificação precisa a nível de espécie

dentro do complexo, devido ao agrupamento dos isolados com espécies diferentes estabelecidas em um mesmo clado.

Resultados semelhantes foram obtidos por AZEVEDO et al., (2017) ao utilizar a região *Tef1* para a identificação de isolados de *Fusarium* patogênicos ao grão de bico provenientes do Brasil. Os isolados foram agrupados em um clado distinto de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, que possui especificidade patogênica ao grão de bico cultivado na Índia, demonstrando que diferentes linhagens filogenéticas de FOOSC podem afetar a cultura. O presente trabalho também apresenta suporte para aferir que os isolados causadores de murcha e amarelecimento em grão de bico, possuem diferentes linhagens filogenéticas, devido ao agrupamento de alguns dos isolados em clados distintos.

É interessante observar a variabilidade de linhagens também pode ocorrer para isolados provenientes de uma mesma região de cultivo, como por exemplo, o isolado CCUB 2288 que foi coletado no município de Posse – GO e agrupou em outro clado, separadamente dos demais obtidos nessa mesma localização. Entretanto, não foi possível fazer uma comparação com as espécies de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, devido a indisponibilidade de sequências *Rpb2* nos bancos de dados.

Em outros países, a etiologia da doença podridão negra das raízes em grão de bico tem sido relacionada a *F. solani* e com *F. solani* f. sp. *pisi* que também causa doenças em ervilha (NENE et al., 2012; ŠIŠI et al., 2018). Entretanto, os resultados do presente trabalho, corroboram com os resultados de outros autores e evidenciam que a doença é causada por um complexo de espécies. Além disso, foi observado que os isolados estudados do FSSC possuem uma ampla distribuição geográfica, devido a obtenção dos isolados em municípios distintos.

A ocorrência de três isolados pertencentes ao FSSC infectando plantas de grão de bico foram relatados no Brasil, dois deles agruparam em um mesmo clado de *F. falciforme* e o outro formou uma linhagem irmã, quando as sequências de *Tef1* foram comparadas (CABRAL et al., 2016). AZEVEDO et al., (2017) compararam a sequência de *Tef1* de outros *F. solani* isolados no Brasil e obtiveram os mesmos resultados, sendo que os isolados pertencentes ao FSSC agruparam no clado 3 do complexo, tendo o *F. falciforme* como grupo irmão.

O *Fusarium falciforme* é um saprófita de solo, porém, possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos e plantas (EDUPUGANTI et al., 2011; NALIM et al., 2011); Em relação as doenças causadas em plantas, o fungo foi relatado causando doenças em mamoeiro no México (VEGA-GUTIÉRREZ et al., 2019), em feijoeiro comum em Cuba (DUARTE et al., 2019), em Veigela (*Weigela florida*) na China (SHEN et al., 2019) e no Brasil

afetando feijão lima (SOUSA et al., 2017). A capacidade destes fungos parasitar diversos hospedeiros pode ser um obstáculo para os programas de melhoramento genético. Diante disso, são necessários estudos para verificar a gama de hospedeiros deste patógeno que está afetando a produção do grão de bico no Brasil.

### 6.3 Expressão de genes de defesa em grão de bico com uso de Extrato de *Rhizobium tropici* (ERT) por meio de RT-qPCR

Os resultados deste trabalho mostraram que a maioria dos genes que codificam as proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas PR), que atuam na defesa contra diferentes patógenos podem ser induzidas utilizando o extrato de *Rhizobium tropici* (ERT). Alguns produtos são relatados na literatura e são comercializados como indutores de resistência, pois possuem a capacidade de elicitar o sistema de defesa de plantas e conferem resistência ampla contra fitopatógenos (CHALFOUN et al., 2018). Como por exemplo, os produtos sintéticos a base do ácido salicílico, capazes de estimular a síntese de Proteínas PR (WAR et al., 2011).

Em decorrência da síntese destas proteínas, plantas de grão de bico exibem melhor desempenho quando desafiadas ao *F. oxysporum*, através da diminuição na incidência da doença e melhor desenvolvimento das plantas (NIGHAT et al., 2005). Outros produtos também possuem eficiência para reduzir o amarelecimento e murcha causados por *F. oxysporum*, através do tratamento de sementes em plantas de soja com o uso de benzothiadiazole e ácidos húmicos, devido a expressão de Proteínas PR (ABDEL-MONAIM et al., 2011).

Em relação aos produtos biológicos, alguns relatos demonstram a capacidade da bactéria *Rhizobium* spp., no controle de fitopatógenos (SHABAN & EL-BRAMAWY, 2011). A supressão de doenças utilizando a bactéria *Rhizobium* spp. pode ser explicada devido a capacidade de micoparasitismo, produção de antibióticos e metabólitos secundários antifúngicos, incluindo cianeto de hidrogênio (HCN), competição por nutrientes, promoção do crescimento das plantas, além da indução da defesa de plantas (SYSTEMS et al., 2007). No presente trabalho são utilizados os lipoquitoligosacarídeos, como indutores de genes de resistência em plantas de grão de bico, os quais são obtidos a partir da fermentação metabólica da bactéria.

Além do envolvimento na nodulação e formação de raízes laterais, estes lipoquitoligosacarídeos atuam em outros processos fisiológicos, como por exemplo, na ativação de genes envolvidos na divisão celular, que pode refletir no estímulo da germinação e

crescimento radicular e aéreo de plântulas (SYSTEMS et al., 2007). Os resultados do presente trabalho, trazem como informações adicionais a capacidade de elicitação do sistema de defesa de plantas, estimulando assim, a expressão de genes relacionados ao sistema defensivo do grão de bico.

Estudos da interação molecular entre grão de bico e *F. oxysporum* indicam que plantas resistentes ao patógeno expressam abundantemente genes que codificam as proteínas PR, enquanto na cultivar suscetível essas proteínas são reguladas negativamente, evidenciando a importância para o enriquecimento na resposta de defesa em conjunto aos genes de Resistência (R) (UPASANI et al., 2017).

Os genes que codificam as proteínas PR possuem diferentes mecanismos de ação, para conferir a resistência da planta hospedeira contra patógenos (COHEN et al., 1993; PINEDA et al., 2010). Os principais mecanismos de ação apresentados por essas proteínas estão relacionados a participação nas vias de sinalização, composição celular, além de exibir ação tóxica a patógenos (PIETERSE et al., 2014).

Em relação as proteínas envolvidas em vias de sinalização, destacam-se as lipoxigenases e dioxigenases, que atuam na iniciação da via das oxilipinas. Essas enzimas desempenham papel importante na proteção contra danos oxidativos, que ocorrem após a infecção de patógenos necrotróficos e resultam na deposição de calose no local de infecção (ANGULO et al., 2015). YU et al., (2009) demonstraram que plantas de tomateiro tratadas com metil-jasmonato, apresentam maior atividade de lipoxigenases e conferem melhor tolerância a *Botrytis cinerea*. Outras enzimas também possuem importância na regulação do estresse oxidativo, como por exemplo a catalase, que atua na homeostase do peróxido de hidrogênio, transformando-o em água e oxigênio (DAT et al., 2001).

Outra enzima que atua na defesa contra patógenos é a fenilalanina amônia-liase, que participa da via metabólica relacionada à síntese dos fenilpropanoides, resultando em compostos fenólicos precursores para a síntese de ésteres, cumarinas, flavonoides e lignina. Estes compostos são importantes para reforçar a parede celular das plantas contra a invasão de patógenos (RAHMAN & PUNJA, 2005). As peroxidases também participam em vias de sinalização e estão relacionadas com a constituição celular, pois atua na lignificação e cicatrização de feridas, além de causar toxicidade a fitopatógenos (PASSARDI et al., 2004).

A maior acumulação dos compostos fenólicos fenilalanina amônia-liase e peroxidases foram observados por SAIKIA et al., (2006), quando plantas de grão de bico foram induzidas com riboflavina e tiveram melhor desempenho no controle da murcha vascular. KUMARI &

KHANNA, (2020) obtiveram resultados semelhantes na expressão destes genes ao induzir a resistência sistêmica em grão de bico com o uso de *Mesorhizobium*, além das plantas apresentarem tolerância quando desafiadas ao *F. oxysporum*.

As Proteínas PR também podem exibir ação antimicrobiana, como por exemplo as enzimas quitinase e glucanase que apresentam ação direta contra os fungos, pois atuam na hidrólise de ligações de *N*-acetylglucosamine e de  $\beta$ -1,3glucanos, respectivamente e podem causar danos a parede celular, como demonstrado por EISSA et al., (2017), ao superexpressar o gene CHI26 em plantas de trigo, no qual conferiu resistência a fungos causadores de ferrugens. Uma maior expressão de glucanase foi encontrada por TIAN et al., (2006), em frutas de *Ziziphus jujuba* e houve o controle de *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*.

As defensinas são peptídeos produzidos pelas plantas e possuem ação direta a fitopatógenos, de forma inespecífica contra fungos e bactérias em resposta a invasão da membrana celular (JENSSEN et al., 2006). As plantas possuem diferentes isoformas desta enzima e nem sempre todas elas apresentam níveis altos de expressão, o que pode explicar a baixa atividade de defensinas neste presente trabalho, visto que foi analisado a expressão de uma isoforma para esta enzima (TANTONG et al., 2016). Devido a capacidade do extrato de *Rhizobium tropici* na indução de genes relacionados a defesa do grão de bico, produtos a partir deste, poderão ser uma ferramenta promissora para o manejo de fitopatógenos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As características morfológicas foram úteis para a distinção dos isolados do complexo de espécies *F. oxysporum* dos isolados do complexo de espécies *F. solani*.
- Os resultados das análises filogenéticas demonstraram que dois complexos de espécies do gênero *Fusarium* estão causando doenças em grão de bico nas regiões amostradas. Embora não seja possível a comparação com outras espécies relatadas em grão de bico, devido à ausência de sequências de *Rpb2* depositadas em banco de dados, estudos posteriores poderão esclarecer melhor as relações filogenéticas em *F. oxysporum* que afetam o grão de bico, através do sequenciamento de outras regiões genômicas.
- Os resultados das análises de RT-qPCR mostraram que o extrato de *Rhizobium tropici* foi capaz de modular positivamente a expressão da maioria dos genes que codificam as proteínas PR, devido a capacidade do extrato metabólico fermentado obtido através da bactéria elicitar o sistema de defesa da planta.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MONAIM, M. F.; ISMAIL, M. E.; MORSY, K. M. Induction of Systemic Resistance of Benzothiadiazole and Humic Acid in Soybean Plants against Fusarium Wilt Disease. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 290–298, dez. 2011.
- AKHTAR, M. S.; SHAKEEL, U.; SIDDIQUI, Z. A. Biocontrol of Fusarium wilt by *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Rhizobium sp.* on lentil. v. 34, p. 1–7, 2010.
- ALLOOSH, M.; HAMWIEH, A.; AHMED, S.; ALKAI, B. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* isolates affecting chickpea in Syria. **Crop Protection**, v. 124, n. June, p. 104863, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104863>>.
- ANGULO, C.; DE, M.; LEYVA, O.; FINITI, I.; LÓPEZ-CRUZ, J.; FERNÁNDEZ-CRESPO, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Role of dioxygenase DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants against *Botrytis cinerea*. **Journal of Plant Physiology**, v. 175, p. 163–173, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.004>>.
- AOKI, T.; DONNELL, K. O. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense sp. nov.*, *F. cuneirostrum*. p. 162–183, 2005.
- ARFAOUI, A.; HADRAMI, A. El; MABROUK, Y.; SIFI, B.; BOUDABOUS, A.; HADRAMI, I. El; DAAYF, F.; CHE, M. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. v. 45, p. 470–479, 2007.
- ARTIAGA, O. P.; SPEHAR, C. R.; BOITEUX, L. S.; NASCIMENTO, W. M. Avaliação de genótipos de grão de bico em cultivo de sequeironas condições de Cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 102–109, 2015.
- AVANCINI, S. R. .; SALES, A. M. .; AGUIRRE, J. M. .; MANTOVANI, D. M. B. Composição química e valor nutricional de cultivares de grão-de-bico produzidos no Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 22, p. 145–153, 1992.
- AVELAR, R. I. S. **Produção e qualidade de sementes de grão-de-bico em diferentes épocas de plantio e colheita no norte de minas gerais**. 2016.
- AZEVEDO, D. M. Q.; ROCHA, F. S.; COSTA, C. A.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; MELO, M. P.; SILVA, J. G.; FERNANADES, M. D. F. G. Etiology of root rot and wilt disease of chickpea in Brazil. p. 273–283, 2017.

- AZEVEDO, L. A. **Fungicidas sistêmicos: teoria e prática**. 1. ed. Campinas: EMOPI, 2007.
- BAAYEN, R. P.; DONNELL, K. O.; BONANTS, P. J. M.; CIGELNIK, E.; KROON, L. P. N. M.; ROEBROECK, E. J. A.; WAALWIJK, C. Gene Genealogies and AFLP Analyses in the *Fusarium oxysporum* Complex Identify Monophyletic and Nonmonophyletic Formae Speciales Causing Wilt and Rot Disease. **Ecology and Population Biology**, v. 90, n. 8, p. 891–900, 2000.
- BAIDER, A.; COHEN, Y. Synergistic interaction between BABA and mancozeb in controlling *Phytophthora infestans* in potato and tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. **Phytoparasitica**, v. 31, n. 4, p. 399–409, 2003.
- BOUHADIDA, M.; JENDOUBI, W.; GARGOURI, S.; BEJI, M.; KHARRAT, M.; CHEN, W. First Report of *Fusarium redolens* Causing Fusarium Yellowing and Wilt of Chickpea in Tunisia. **Plant Disease**, v. 101, n. 6, p. 1038, 27 fev. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1114-PDN>>.
- BRAGA, N. R.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R. F. **Comportamento de cultivares de Grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) na microrregião de Viçosa, Minas Gerais** *Revista Ceres*, 1997. .
- CABRAL, C. S.; MELO, M. P.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; REIS, A. A Root Rot of Chickpea Caused by Isolates of the *Fusarium solani* Species Complex in Brazil. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2171, 26 abr. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0571-PDN>>.
- CARRERAS, J.; MAZZUFERI, V.; KARLIN, M. **EL CULTIVO DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) EN ARGENTINA**. [s.l: s.n.]
- CASTRESANA, C. Role of 9-Lipoxygenase and a -Dioxygenase Oxylin Pathways as Modulators of Local and Systemic Defense. **MOLECULAR PLANT**, v. 5, p. 914–928, 2011.
- CASTRO, O. L.; BACH, E. E. Increased production of  $\beta$ -1, 3 glucanase and proteins in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 165–169, 2004.
- CHALFOUN, N. R.; DURMAN, S. B.; BUDEGUER, F.; CARO, M. d. P.; BERTANI, R. P.; DI PETO, P.; STENGLEIN, S. A.; FILIPPONE, M. P.; MORETTI, E. R.; DÍAZ RICCI, J. C.; WELIN, B.; CASTAGNARO, A. P. Development of PSP1, a Biostimulant Based on the Elicitor AsES for Disease Management in Monocot and Dicot Crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 844, 2018.
- CHATURVEDI, S. K.; JHA, S. K.; SINGH, N. P. Technological And Policy Intervention For

Increasing Chickpea Production In India. n. 01, p. 7–12, 2018.

CHEHRI, K.; SALLEH, B.; ZAKARIA, L. Morphological and Phylogenetic Analysis of *Fusarium solani* Species Complex in Malaysia. **FUNGAL MICROBIOLOGY**, p. 457–471, 2015.

COBOS, M. J.; RUBIO, J.; FERNÁNDEZ-ROMERO, M. D.; GARZA, R.; MORENO, M. T.; MILLÁN, T.; GIL, J. Genetic analysis of seed size, yield and days to flowering in a chickpea recombinant inbred line population derived from a Kabuli × Desi cross. **Annals of Applied Biology**, v. 151, n. 1, p. 33–42, 2007.

COHEN, Y.; GISI, U.; NIDERMAN, T. **Local and Systemic Protection Against Phytophthora infestans Induced in Potato and Tomato Plants by Jasmonic Acid and Jasmonic Methyl Ester**.PDF, 1993. .

COLLINGE, D. .; KRAGH, K. .; MIKKELSEN, J. .; NIELSEN, K. .; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 31–40, 1993.

CONRATH, P. G. U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M.; PIETERSE, C. M. J.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming : Getting Ready for Battle. v. 19, n. 10, p. 1062–1071, 2009.

DAT, J. F.; INZE, D.; BREUSEGEM, F. Van; DAT, J. F.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. Van. Catalase-deficient tobacco plants: tools for in planta studies on the role of hydrogen peroxide. **Redox Report**, v. 6, p. 7, 2001.

DOKE, N.; MIURA, Y.; SANCHEZ, L. M.; NORITAKE, T.; YOSHIOKA, H.; KAWAKITA, K. The oxidative burst protects plants against pathogen attack Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence — a review. 1996.

DUARTE, Y.; MARTÍNEZ, B.; SANTOS, E.; SOUZA, C. De; CAFÉ, A. C. First report of *Fusarium falciforme* affecting common bean ( *Phaseolus vulgaris* ) in Cuba. **New Disease Reports**, v. 40, p. 5197, 2019.

DUBEY, S. C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v. 40, n. 1, p. 118–127, 2007.

DURRANT, W. E.; DONG, X. SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. p. 185–209, 2004.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDUPUGANTI, S.; ROUPHAEL, N.; MEHTA, A.; EATON, M.; HELLER, J. G.;

BRESSLER, A.; BRANDT, M.; DONNELL, K. O. *Fusarium falciforme* Vertebral Abscess and Osteomyelitis : Case Report and Molecular Classification. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2350–2353, 2011.

EISSA, H. F.; HASSANIEN, S. E.; RAMADAN, A. M.; SHAMY, M. M. El; SALEH, O. M.; SHOKRY, A. M.; ABDELSATTAR, M.; MORSY, Y. B.; MAGHRABY, M. A. El; ALAMELDIN, H. F.; HASSAN, S. M.; OSMAN, G. H.; MAHFOUZ, H. T.; GAD, G. A.; KARIM, E.; MADKOUR, M. A. Developing transgenic wheat to encounter rusts and powdery mildew by overexpressing barley chi26 gene for fungal resistance. **Plant Methods**, p. 1–13, 2017.

ESPINAS, N. A.; SAZE, H.; SAIJO, Y. Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. August, p. 1–7, 2016.

FARMAKI, T.; SANMARTIN, M.; JIMÉNEZ, P.; PANEQUE, M.; SANZ, C.; VANCANNEYT, G.; LEÓN, J.; SERRANO, J, J, S.; SA, J. J. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 555–568, 2006.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. v. 8, p. 677–700, 2007.

GASCO, M. M. J.; CORTÉS, J. A. N.; DÍAZ, R. M. J. Evolución de *Fusarium oxysporum* f . sp . *ciceris* , el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. p. 59–69, 2005.

GAUR, P. M.; TRIPATHI, S.; GOWDA, C. L.; RAO, G. R.; SHARMA, H.; PANDE, S.; MAMTA, S. Chickpea Seed Production Manual. **Communication**, p. 22, 2010.

GERLACH, W. .; NIREMBERG, H. **The genus Fusarium a pictorial atlas**. Berlin: Biologischen Bundesanstalt fur Land-und Forstwirtschaft, 1982.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: It's all the world to induced disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, n. 3, p. 233–242, 2008.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the Fusarium Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 23–39, 4 ago. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>>.

GURJAR, G.; BARVE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f . sp . *ciceris* with gene specific , ITS and random markers. **Mycologia**, v. 101:4, p. 484–495, 2017.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. p. 1102–1157.

HASANZADE, F.; RASTEGAR, M.; JAFARPOUR, B.; KERMANI, M. Identification of *Fusarium solani* F. sp. pisi the Cause of Root Rot in Chickpea and Assessment of its Genetic Diversity Using AFLP in Northeast Iran. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, 1 jan. 2008.

HAWARE, M. .; NENE, Y. L.; RAJESHWARI, R. **Erradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris transmitted in Chickpea Seed**. [s.l: s.n.].

HAWARE, M. P.; NENE, Y. L. **Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri** *Plant Disease*, 1982.

HOSKEM, B. C. S. Época de plantio de grão-de-bico em Montes Claros, Minas Gerais: Produtividade e qualidade de sementes. p. 65f, 2014.

HYUN, M. W.; YUN, Y. H.; KIM, J. Y.; KIM, S. H. Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. **Review article**, v. 39, n. 4, p. 257–265, 2011.

INDEXFUNGORUM. **Index Fungorum**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

JANCZAREK, M.; RACHWAŁ, K.; MARZEC, A.; GRZADZIEL, J.; PALUSIŃSKA-SZYSZ, M. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 94–113, 2015.

JENDOUBI, W.; BOUHADIDA, M.; BOUKTEB, A.; BÉJI, M.; KHARRAT, M. *Fusarium* Wilt Affecting Chickpea Crop. **Agriculture**, v. 7, n. 3, p. 23, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-0472/7/3/23>>.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; ALCALA, A.; HERVAS, A.; TRAPERO CASAS, J. L. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*/*Cicer arietinum* pathosystem. **Hodowla Roslin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo**, v. 37, n. 3, p. 87–94, 1993. Disponível em: <<https://geoscience.net/research/002/452/002452979.php>>.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; CASTILLO, P.; JIMÉNEZ-GASCO, M. del M.; LANDA, B. B.; NAVAS-CORTÉS, J. A. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. **Crop Protection**, v. 73, p. 16–27, 2015.

JIMENEZ-DIAZ, R. M.; BASALLOTE-UREBA, M. J.; RAPOPORT, H. **Colonization and**

**pathogenesis in chickpeas infected by races of fusarium oxysporum f, sp, ciceri.** [s.l: s.n.]  
JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M. **Integrated Management of Fusarium Wilt Diseases.** [s.l: s.n.]

JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, D.; LANDA, B. B.; KANG, S.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; NAVAS-CORTES, J. A. Quantitative and Microscopic Assessment of Compatible and Incompatible Interactions between Chickpea Cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Races. v. 8, n. 4, 2013.

JIMENEZ-GASCO, M. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M. M.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Development of a Specific Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Its Pathogenic Races 0, Development of a Specific Polymerase Chain Reaction-Based Assay for the Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and Its Pathogenic Races 0, 1A, 5, and 6. n. June 2014, 2003.

KUMAR, H.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of *Fusarium* wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1396–1403, 2011. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.05.001>>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 22 mar. 2016. Disponible em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>>.

KUMARI, P.; KHANNA, V. Allelopathic effects of native *Bacillus* sp. against *Fusarium oxysporum* causing chickpea wilt. v. 38, n. January, p. 77–90, 2016.

KUMARI, S.; KHANNA, V. Induction of Systemic Resistance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* by Antagonistic Rhizobacteria in Assistance with Native Mesorhizobium. **Current Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 85–98, 2020. Disponible em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-019-01805-6>>.

LANDA, B. B.; HERVÁS, A.; BETTIOL, W.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.

**Phytoparasitica**, v. 25, n. 4, p. 305–318, 1997.

LANDA, B. B.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M. Integrated Management of *Fusarium* Wilt of Chickpea with Sowing Date, Host Resistance, and Biological Control.

**Phytopathology**, v. 94, n. 9, p. 946–960, 2004. Disponible em:

<<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2004.94.9.946>>.

LAWTON, K. A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.;

KESSMANN, H.; STAUB, T.; I, J. R. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, v. 10, p. 71–82, 1996.

LESLIE, J. .; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium Laboratory Manual**. 1. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006.

LESLIE, J. F. FUNGAL VEGETATIVE COMPATIBILITY. **Annual Review of Phytopatology**, v. 31, p. 127–150, 1993.

LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; LESLIE, F.; LIMA, C. S.; PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; COSTA, S. S.; ABREU, L. M.; LESLIE, J. F. *Fusarium tupiense* sp . nov ., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex that causes mango malformation in Brazil complex that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 5514, p. 13, 2012.

LIU, Y. J.; WHELEN, S.; HALL, B. D. Phylogenetic Relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799–1808, dez. 1999.

LLORENS, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; LAPEÑA, L. Advances in induced resistance by natural compounds : towards new options for woody crop protection. v. 1, n. February, p. 90–100, 2017.

LOMBARD, L.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomic chaos. **Persoonia**, v. 43, p. 1–47, 2019.

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

MAESEN, L. J. G. Van Der. Origin, History and Taxonomy of Chickpea. **Origin, history and taxonomy of chickpea**, n. 1883, p. 11–34, 1987. Disponível em: <<http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/304694>>.

MAITI, R.; WESCHE-EBELING, P. The chickpea crop. In: **Advances in chickpea science**. Science pu ed. [s.l: s.n.]p. 1–32.

MANDHARE, V. K.; DESHMUKH, G. P.; PATIL, J. V; KALE, A. A.; CHAVAN, U. D. MORPHOLOGICAL , PATHOGENIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Fusarium oxysporum* f . sp . *ciceri* ISOLATES FROM MAHARASHTRA , INDIA. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 12, p. 47–56, 2011.

MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp . and

- Azospirillum brasilense inoculants with soybean and maize. p. 1–10, 2013.
- MARZANI, Q. A. Organic and non-organic soil amendments as sound method to combat chickpea wilt ' s soilborne fungus Fusarium oxysporum f . sp . ciceris. **Journal of Pure and Applied Sciences**, n. March, 2017. Disponível em:  
<<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.2004.94.9.946>>.
- MATUO, T.; SNYDER, W. C. Use of morphology and mating populations in the identification of formae speciales in Fusarium solani. **Phytopathology**, v. 63, p. 562–565, 1973.
- MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F. Van; NOCTOR, G. Catalase function in plants : a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 2010.
- MICHEREFF, S. J.; DOMINGOS, E. G. T. .; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. [s.l: s.n.]
- MICHIELSE, C. .; REP, M. Pathogen profile update : Fusarium oxysporum. **Molecular plant pathology**, v. 10, p. 311–324, 2009.
- MITRA, A.; CHATTERJEE, C.; MANDAL, F. B. **Synthetic Chemical Pesticides and Their Effects on Birds**. Bankura, 2011. .
- MORANDI, M. A. .; BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil Marcos Históricos do Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. p. 7–15, 2008.
- NALIM, F. A.; SAMUELS, G. J.; WIJESUNDERA, R. L.; GEISER, D. M.; NALIM, F. A.; SAMUELS, G. J.; WIJESUNDERA, R. L.; GEISER, D. M.; SAMUELS, G. J. New species from the Fusarium solani species complex derived from perithecia and soil in the Old World tropics. **Mycologia**, v. 5514, n. 103:6, p. 30, 2011.
- NASCIMENTO, W. M.; PESSOA, H. B. S. V.; GIORDANO, L. de B. Cultivo do grao-de-bico ( Cicer arietinum L .). p. 1–12, 1998.
- NENE, Y. .; REDDY, M. .; HAWARE, M. .; GHANEKAR, A. .; AMIN, K. .; PANDE, S.; SHARMA, M. **Field Diagnosis of Chickpea and their Control**. [s.l: s.n.]
- NIGHAT, N. .; ZAHID, M. .; HAQ, I.; JAMIL, F. Induction of systemic resistance in chickpea against fusarium wilt by seed treatment with salicylic acid and bion. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 4, p. 989–995, 2005.
- O`DONNELL, K. Molecular phylogeny of the Nectria haematococca- Fusarium solani species complee. **Mycologia**, v. 92:05, p. 919–938, 2000.
- O`DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M.

G.; BRANDT, M. E.; ZHANG, N.; GEISER, D. M. Molecular Phylogenetic Diversity , Multilocus Haplotype Nomenclature , and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex Molecular Phylogenetic Diversity , Multilocus Haplotype Nomenclature , and In Vitro Antifungal Resistance. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. May 2014, p. 2477–2490, 2008.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P. W.; GEISER, D. M.; KANG, S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica**, v. 43, p. 583–595, 2015.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434–458, 1998.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 19–28, 2001.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical : how plant peroxidases modify the cell wall. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, n. 11, 2004.

PFÄFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 37, n. 3, p. 1141, 2017.

PIETERSE, M. J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; WEES, S. C. M. Van; BAKKER, P. A. H. M. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347–375, 2014.

PINEDA, A.; ZHENG, S.; LOON, J. J. A. Van; DICKE, M. Helping plants to deal with insects : the role of beneficial soil-borne microbes. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 507–514, 2010.

PINHO, D. B.; FIRMINO, A. L.; FERREIRA-JUNIOR, W. G.; PEREIRA, O. L. An efficient protocol for DNA extraction from. **Mycotaxon**, v. 122, p. 333–345, 2012.

PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso**. [s.l.: s.n.].

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches over Likelihood Ratio Tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793–808, out. 2004.

PRASAD, R. D.; RANGESHWARAN, R.; HEGDE, S. V.; ANUROOP, C. P. Effect of soil and seed application of *Trichoderma harzianum* on pigeonpea wilt caused by *Fusarium udum* under field conditions. **Crop Protection**, v. 21, n. 4, p. 293–297, 2002.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1103–1114, 2005.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability Distribution of Molecular Evolutionary Trees: A New Method of Phylogenetic Inference. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 304–311, set. 1996.

REDDY, D. S.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; REDDY, P. S.; SRI CINDHURI, K.; SIVAJI GANESH, A.; SHARMA, K. K. Identification and Validation of Reference Genes and Their Impact on Normalized Gene Expression Studies across Cultivated and Wild Cicer Species. **Plos one**, v. 11, n. 2, p. 19, 10 fev. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148451>>.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572–1574, 12 ago. 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>>.

SAIKIA, R.; SINGH, T.; KUMAR, R.; SRIVASTAVA, J.; SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, K. SA in Wilt disease. v. 158, p. 203–213, 2003.

SAIKIA, R.; YADAV, M.; VARGHESE, S.; SINGH, B. P.; GOGOI, D. K.; KUMAR, R.; ARORA, D. . Role of riboflavin in induced resistance against Fusarium wilt and Charcoal rot diseases of chickpea. **Plant Pathology**, v. 24, p. 339–347, 2006.

SAIKIA, R.; VARGHESE, S.; SINGH, B. P.; ARORA, D. K. Influence of mineral amendment on disease suppressive activity of *Pseudomonas fluorescens* to Fusarium wilt of chickpea. **Microbiological Research**, v. 164, n. 4, p. 365–373, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2007.05.001>>.

SALCEDO, S. S.; SANTIAGO, T. R.; COLMAN, A. A.; BARRETO, R. W. First Report of Bacterial Wilt of Chickpea Caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 4, p. 629, 21 nov. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1328-PDN>>.

SCHROERS, H.; SAMUELS, G. J.; ZHANG, N.; SHORT, D. P. G.; JUBA, J.; GEISER, D. M.; SAMUELS, G. J.; ZHANG, N.; SHORT, D. P. G. Epitypification of *Fusarium solani* and its assignment to a common phylogenetic species in the *Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 108:4, p. 806–809, 2016.

SHABAN, W. I.; EL-BRAMAWY, M. A. Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and *Trichoderma* on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. **International Research Journal of Agricultural**

**Science and Soil Science**, v. 1, n. 3, p. 98–108, 2011.

SHARMA, M.; SENGUPTA, A.; GHOSH, R.; AGARWAL, G.; TARAFDAR, A.; NAGAVARDHINI, A.; PANDE, S.; VARSHNEY, R. K. Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep37353>>.

SHARMA, R. D. ALGUMAS INFORMAÇÕES SOBRE A CULTURA DO GRÃO-DE-BICO (*Cicer arietinum* L.). p. 20, 1984. Disponível em: <<https://store.unity.com/configure-plan/unity-pro>>.

SHEN, D.-X.; SONG, Z.-W.; LU, Y.-M.; FAN, B. First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) Causing Root Rot in *Weigela florida* in China. **Plant Disease**, p. PDIS-03-19-0521-PDN, 20 nov. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0521-PDN>>.

SINGH, F.; DIWAKAR, B. Chickpea botany and production practices. **ICRISAT Skills Developmentment Series**, n. No.16, p. 164, 1995.

SINGH, G.; CHEN, W.; RUBIALES, D.; MOORE, K.; SHARMA, Y. R.; GAN, Y. Chickpea Breeding and Management. In: KANTAR, F. et al. (Ed.). **Chickpea Breeding and Management**. [s.l.: s.n.]p. 179–192.

SINGH, R. J.; CHUNG, G. H.; NELSON, R. L. Landmark research in legumes. **Genome**, v. 50, n. 6, p. 525–537, 2007b. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/G07-037>>.

ŠIŠI, A.; BA, J.; AL-HATMI, A. M. S.; KARLOVSKY, P.; AHMED, S. A.; MAIER, W.; HOOG, G. S. De; FINCKH, M. R. The ‘ forma specialis ’ issue in *Fusarium* : A case study in *Fusarium solani* f . sp . *lisi*. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 8:1252, n. September 2017, p. 1–17, 2018.

Sistema de agrotóxicos fitossanitários. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br/>>.

SMITHA, K. P.; RAJESWARI, E.; ALICE, C. D.; RAGUCHANDER, T. Evaluation of *Bacillus subtilis* for the management of dry root rot and vascular wilt of chickpea. v. 6, n. 6, p. 967–970, 2017.

SOUSA, E. S.; MELO, M. P.; MOTA, J. M.; SOUSA, E. M. J.; BESERRA, J. E. A.; MATOS, K. S. First Report of *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) Causing Root Rot in Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 11, p. 1954, 5 jul. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-17-0657-PDN>>.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 89–100, 2012.

STENERSEN, J. **Chemical pesticides mode of action and toxicology**. 1. ed. [s.l.: s.n.]

STOTZ, H. U.; THOMSON, J. G.; WANG, Y. Plant Defensins: Defense, Development and Application. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 11, p. 1010–1012, nov. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009545>>.

SUMMERELL, B. A.; BOTANIC, R.; SYDNEY, G.; WALES, N. S.; LESLIE, J. F. A Utilitarian Approach to Fusarium Identification. **The American Phytopathological Society**, n. February, p. 117–128, 2003.

SUNG, G.-H.; SUNG, J.-M.; HYWEL-JONES, N. L.; SPATAFORA, J. W. A Multi-Gene Phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of Localized Incongruence Using a Combinational Bootstrap Approach. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204–1223, set. 2007.

SYSTEMS, C. P.; HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; CANADA, A. Effect of Seed Treatment with *Rhizobium leguminosarum* on Pythium Damping-off, Seedling Height, Root Nodulation, Root Biomass, Shoot Biomass, and Seed Yield of Pea and Lentil. **Journal of Phytopathology**, v. 37, p. 31–37, 2007.

TANTONG, S.; PRINGSULAKA, O.; WEERAWANICH, K. Peptides Two novel antimicrobial defensins from rice identified by gene coexpression network analyses. **Peptides**, v. 84, p. 7–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2016.07.005>>.

TAYLOR, P.; SINGH, P. K.; SINGH, M.; VYAS, D. Caryologia : International Journal of Cytology , Cytosystematics and Cytogenetics Biocontrol of Fusarium Wilt of Chickpea using Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Rhizobium leguminosorum* Biovar Biocontrol of Fusarium Wilt of Chickpea using Arbuscular Mycorrhizal Fungi and *Rhizobium leguminosorum* Biovar . n. October, p. 37–41, 2014.

TIAN, S. P.; YAO, H. J.; DENG, X.; XU, X. B.; QIN, G. Z.; CHAN, Z. L. Characterization and Expression of  $\beta$ -1,3-Glucanase Genes in Jujube Fruit Induced by the Microbial Biocontrol Agent *Cryptococcus laurentii*. **Phytopathology**, p. 260–268, 2006.

UPASANI, M. L.; LIMAYE, B. M.; GURJAR, G. S.; KASIBHATLA, S. M. Chickpea-*Fusarium oxysporum* interaction transcriptome reveals differential modulation of plant defense strategies. **Scientific Reports**, n. June, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-07114-x>>.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble

leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v. 40, p. 199–211, 1970.

VANLOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. 2006.

VEGA-GUTIÉRREZ, T. A.; TIRADO-RAMÍREZ, M. A.; LÓPEZ-URQUÍDEZ, G. A.; ANGULO-CASTRO, A.; MARTÍNEZ-GALLARDO, J. A.; LÓPEZ-ORONA, C. A. *Fusarium falciforme* (FSSC 3 + 4) Causing Root and Stem Rot in Papaya (*Carica papaya*) in Mexico. **Plant Disease**, v. 103, n. 10, p. 2681, 30 maio 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0917-PDN>>.

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

WANG, Q.; LIU, J.; ZHU, H. **Genetic and Molecular Mechanisms Underlying Symbiotic Specificity in Legume-Rhizobium Interactions** **Frontiers in Plant Science** , 2018. .

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; WAR, M. Y.; IGNACIMUTHU, S. Role of Salicylic Acid in Induction of Plant Defense System in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.). **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1787–1792, nov. 2011.

WESTERLUND, F. V.; JR-CAMPBELL, R. N.; KIMBLE, K. A. Fungal Root Rots and Wilt of Chickpea in California. **Phytopathology**, v. 64, p. 432–436, 1973.

WILLIAMS, P. C.; SINGH, U. Quality screening and evaluation in pulse breeding. In: SUMMERFIELD, R. J. (Ed.). **World crops: cool season food legumes**. [s.l: s.n.]p. 445–534.

WOLOSHUK, C. P.; SHIM, W. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge. **Microbiology reviews**, v. 37, p. 94–109, 2013.

XU, J. Fungal DNA barcoding. **Genome**, v. 59, n. 11, p. 913–932, 30 ago. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046>>.

YU, M.; SHEN, L.; FAN, B.; ZHAO, D.; ZHENG, Y.; SHENG, J. Postharvest Biology and Technology The effect of MeJA on ethylene biosynthesis and induced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. v. 54, p. 153–158, 2009.

YUN, S. H.; ARIE, T.; KANEKO, I.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual gibberella/fusarium species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 7–20, 2000.

ZAREIE, R.; MELANSON, D. L.; MURPHY, P. J. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from Barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*.

**The American Phytopathological Society**, v. 15, n. 10, p. 1031–1039, 2002.

ZHAO, S.; FERNALD, R. D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p. 1047–1064, 2005. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/cmb.2005.12.1047>>.

ZIA-UL-HAQ, M.; IQBAL, S.; AHMAD, S.; IMRAN, M.; NIAZ, A.; BHANGER, M. I. Food Chemistry Nutritional and compositional study of Desi chickpea ( *Cicer arietinum* L .) cultivars grown in Punjab , Pakistan. v. 105, p. 1357–1363, 2007.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Códigos de acessos no GenBank dos isolados do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* utilizados na análise filogenética

Espécie	Isolado	Acesso no GenBank <i>Rpb2</i>
<i>F. triseptatum</i>	CBS <sup>1</sup> 258.50	MH484873
<i>F. curvatum</i>	CBS 247.61	MH484876
<i>F. curvatum</i>	CBS 238.94	MH484893
<i>F. curvatum</i>	CBS 141.95	MH484894
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 130303	MH484923
<i>F. triseptatum</i>	CBS 116619	MH484910
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115416	MH484902
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 115417	MH484903
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 123062	MH484919
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 149.25	MH484865
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 181.32	MH484867
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 196.87	MH484886
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 758.68	MH484877
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 840.88	MH484887
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 127.81	MH484883
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 129.24	MH484864
<i>F. oxysporum</i>	CPC <sup>2</sup> 25822	MH484943
<i>F. oxysporum medicaginis</i>	CBS 221.49	MH484872
<i>F. oxysporum</i>	CBS 144134	MH484953
<i>F. oxysporum</i>	CBS 144135	MH484954
<i>F. nirenbergiae</i>	CBS 744.79	MH484882
<i>F. pharetrum</i>	CPC 30822	MH484951
<i>F. pharetrum</i>	CPC 30824	MH484952
<i>F. hoodiae</i>	CBS 132474	MH484929
<i>F. odoratissimum</i>	CBS 130310	MH484922
<i>F. odoratissimum</i>	CBS 794.70	MH484878
<i>F. hoodiae</i>	CBS 132476	MH484930
<i>F. libertatis</i>	CPC 25782	MH484932
<i>F. libertatis</i>	CPC 28465	MH484944
<i>F. duoseptatum</i>	CBS 102026	MH484896
<i>F. trachichlamydosporum</i>	CBS 102028	MH484897
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116611	MH484907
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116612	MH484908
<i>F. gossypinum</i>	CBS 116613	MH484909
<i>F. glycines</i>	CBS 176.33	MH484868
<i>F. glycines</i>	CBS 200.89	MH484888
<i>F. glycines</i>	CBS 214.49	MH484869
<i>F. carminascens</i>	CPC 25792	MH484934
<i>F. carminascens</i>	CPC 25793	MH484935
<i>F. carminascens</i>	CPC 25800	MH484937
<i>F. fabacearum</i>	CPC 25801	MH484938
<i>F. fabacearum</i>	CPC 25802	MH484939

**Anexo 1.** Continuação

<i>F. fabacearum</i>	CPC 25803	MH484940
<i>F. glycines</i>	CPC 25808	MH484942
<i>F. callistephi</i>	CBS 115423	MH484905
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 680.89	MH484889
<i>F. cugenangense</i>	CBS 620.72	MH484879
<i>F. cugenangense</i>	CBS 130304	MH484921
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 130323	MH484927
<i>F. cugenangense</i>	CBS 131393	MH484928
<i>Fusarium</i> sp.	CBS 128.81	MH484884
<i>F. callistephi</i>	CBS 187.53	MH484875
<i>F. inflexum</i>	NRRL <sup>3</sup> 20433	JX171583.1
<i>F. elaeidis</i>	CBS 217.49	MH484870
<i>F. elaeidis</i>	CBS 255.52	MH484874
<i>F. languescens</i>	CBS 119796	MH484917
<i>F. languescens</i>	CBS 872.95	MH484895
<i>F. languescens</i>	CBS 645.78	MH484880
<i>F. foetens</i>	CBS 120665	MH484918

<sup>1</sup> Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (WIFI), Utrecht, The Netherlands, <sup>2</sup> Collection of P.W. Crous; <sup>3</sup> Agricultural Research Service Culture Collection.

**Anexo 2.** Códigos de acessos no GenBank dos isolados do complexo de espécies *Fusarium solani* utilizados na análise filogenética

Espécie	Isolado	Acesso no GenBank
		<i>Rpb2</i>
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL <sup>1</sup> 45880	EU329640
<i>F. solani</i> f.sp. <i>psi</i>	NRRL 22820	EU329532
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22278	EU329501
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 28009	EF470136.1
<i>F. solani</i>	CBS <sup>2</sup> 135789	KU604374.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 43507	DQ790578.1
<i>F. petrophilum</i>	NRRL 28546	EU329544.1
<i>Fusarium</i> sp. <i>cucurbitae</i>	NRRL 22141	EU329491
<i>F. petrophilum</i>	CBS 135955	KJ867426
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 31158	EU329559.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22389	EU329506.1
<i>N. cyanescens</i>	NRRL 37625	EU329637.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 32437	EU329581.1
<i>N. macrospora</i>	CPC <sup>3</sup> 28191	LT746331
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 28541	EU329542
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22642	EU329522.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 28008	EF470135.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 46707	EU329665.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 31169	KR673999.1
<i>F. witzzenhausenense</i>	KU <sup>4</sup> 90.15	MG237866
<i>F. witzzenhausenense</i>	KU 90.1.15	MG237867
<i>F. solani</i>	KU Fs30	KY556553

**Anexo 2.** Continuação

<i>Fusarium</i> sp.	GJS <sup>5</sup> 091458	KT313616
<i>F. solani</i>	KU Fs29	KY556552
<i>F. solani</i> f. sp. <i>batatas</i>	NRRL 22400	EU329509
<i>F. solani</i> f. sp. <i>xanthoxyli</i>	NRRL 22163	EU329496.1
<i>F. solani</i>	NRRL 32810	EU329624.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22611	EU329518.1
<i>F. solani</i> f. sp. <i>robiniae</i>	NRRL 22161	EU329494.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22230	EU329499
<i>F. solani</i> f. sp. <i>mori</i>	NRRL 22157	EU329493
<i>F. keratoplasticum</i>	FRC <sup>6</sup> S2477	KR673969
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22608	EU329517.1
<i>F. keratoplasticum</i>	NRRL 43433	DQ790561.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 32751	EU329611.1
<i>F. falciforme</i>	NRRL 43441	DQ790566.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 43467	EF469979.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22436	EU329511
<i>Neocosmospora vasinfecta</i>	NRRL 22166	EU329497
<i>F. lichenicola</i>	NRRL 34123	EU329635
<i>F. brasiliense</i>	NRRL 31757	EU329565
<i>F. phaseoli</i>	NRRL 22276	JX171608
<i>F. virguliforme</i>	NRRL 22825	GU170599
<i>F. kurunegalense</i>	NRRL 22387	EU329505
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22395	EU329507.1
<i>F. plagianthi</i>	NRRL 22632	JX171614
<i>F. illudens</i>	NRRL 22090	JX171601
<i>F. rectiphorus</i>	NRRL 22396	EU329508
<i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i>	NRRL 22153	EU329492.1
<i>Fusarium</i> sp. <i>cucurbitae</i>	NRRL 22098	EU329489
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22570	EU329513
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22178	EU329498
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 46703	EU329661.1
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 32755	EU329613.1
<i>F. striatum</i>	NRRL 22101	EU329490.1
<i>Neocosmospora croci</i>	CPC 27186	LT746329
<i>Fusarium</i> sp.	NRRL 22579	EU329515
<i>F. ambrosium</i>	NRRL 20438	JX171584.1
<i>F. ambrosium</i>	NRRL 22354	EU329504.1
<i>F. staphyleae</i>	NRRL 22316	JX171609.1

<sup>1</sup> Agricultural Research Service Culture Collection; <sup>2</sup> Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (WIFB), Utrecht, The Netherlands; <sup>3</sup> Collection of P.W. Crous; <sup>4</sup>KU Specimen number in the University of Kassel collection, Witzenhausen, Germany; <sup>5</sup>Collection of G.J. Samuels, USDA-ARS, USA; HFEW: As in Ibarra-Laclette et al. (2017); <sup>6</sup>FRC: Fusarium Research Center, Pennsylvania State University, PA, USA

### Anexo 3. Relative Expression Report

#### Assay Parameters

Parameter	Value
Iterations	2000

#### Results

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
CHIT 1 24 h	TRG	0,9211	0,988	0,445 - 1,951	0,305 - 2,666	0,966	
CHIT 1 48 h	TRG	0,9211	6,081	2,905 - 12,497	1,425 - 18,175	0,000	UP
LOX 1 24h	TRG	0,8902	4,056	2,016 - 7,725	1,659 - 14,205	0,000	UP
LOX 1 48h	TRG	0,8902	9,736	6,515 - 16,045	3,878 - 21,901	0,000	UP
DOX 1 24h	TRG	0,8534	3,623	1,499 - 7,001	1,142 - 9,095	0,000	UP
DOX 1 48h	TRG	0,8534	5,633	2,750 - 11,859	1,305 - 15,817	0,000	UP
CAT 4 24h	TRG	0,8485	2,230	1,500 - 3,395	1,112 - 4,851	0,000	UP
CAT 4 48h	TRG	0,8485	2,945	2,101 - 4,208	1,533 - 6,305	0,000	UP
VPS 24h	REF	0,8577	1,163				
VPS 48h	REF	0,8577	1,289				
SP41A 24h	TRG	0,8776	0,185	0,106 - 0,289	0,079 - 0,445	0,000	DOWN
SP41A 48h	TRG	0,8776	0,339	0,106 - 3,419	0,058 - 4,278	0,044	DOWN
DEF 1 24h	TRG	0,8496	0,585	0,323 - 1,212	0,248 - 2,007	0,030	DOWN
DEF 1 48h	TRG	0,8496	0,893	0,497 - 1,717	0,314 - 2,534	0,563	
PER 10 24h	TRG	0,9379	1,708	1,135 - 2,644	0,759 - 3,972	0,006	UP
PER 10 48h	TRG	0,9379	3,337	1,957 - 5,963	1,155 - 10,251	0,000	UP
PAL 2 24h	TRG	0,843	2,506	1,243 - 4,547	0,819 - 8,770	0,001	UP
PAL 2 48h	TRG	0,843	4,066	2,356 - 7,526	1,311 - 14,431	0,000	UP
UCP 24h	REF	0,8517	0,708				
UCP 48h	REF	0,8517	0,943				
G6PD 24h	TRG	0,8655	0,597	0,237 - 1,430	0,037 - 4,357	0,174	
G6PD 48h	TRG	0,8655	2,022	0,953 - 3,590	0,622 - 9,001	0,008	UP
GAPDH 24h	TRG	0,8414	1,562	1,305 - 1,918	1,118 - 2,293	0,000	UP
GAPDH 48h	TRG	0,8414	2,887	2,270 - 3,630	1,776 - 4,267	0,000	UP

#### Legend:

*P(H1)* - Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

TRG - Target

REF - Reference