



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LAÍS SOUTO LIRA**

***Fusarium proliferatum* ASSOCIADO AO FEIJÃO-CAUPI: CARACTERIZAÇÃO,  
DIVERSIDADE GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO BIOGEOGRÁFICA E  
BIOCONTROLE**

**AREIA  
2025**

**LAIS SOUTO LIRA**

***Fusarium proliferatum* ASSOCIADO AO FEIJÃO-CAUPI: CARACTERIZAÇÃO,  
DIVERSIDADE GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO BIOGEOGRÁFICA E  
BIOCONTROLE**

Trabalho de conclusão de curso da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador:** Prof(a). Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento

**AREIA**

**2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

L768f Lira, Lais Souto.

Fusarium proliferatum associado ao feijão-caupi:  
caracterização, diversidade genética, distribuição  
biogeográfica e biocontrole / Lais Souto Lira. -  
Areia:UFPB/CCA, 2025.

52 f. : il.

Orientação: Luciana Cordeiro do Nascimento.  
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Ciências Biológicas. 2. Vigna unguiculata L. 3.  
Controle biológico. 4. Patologia de sementes. I.  
Cordeiro do Nascimento, Luciana. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 573(02)

**LAIS SOUTO LIRA**

***Fusarium proliferatum* ASSOCIADO AO FEIJÃO-CAUPI: CARACTERIZAÇÃO,  
DIVERSIDADE GENÉTICA, DISTRIBUIÇÃO BIOGEOGRÁFICA E  
BIOCONTROLE**

Trabalho de conclusão de curso da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30 de setembro de 2024

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof(a) Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento  
(DFCA/CCA/UFPB)  
**Orientadora**



---

Dra Otília Ricardo de Farias  
(DFCA/CCA/UFPB)  
**Examinadora**



---

Dra. Loise Araújo Costa  
(DB/CCA/UFPB)  
**Examinadora**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, que me conduz com amor e paciência, hoje e sempre.

Aos meus amados pais, Ericka e Laerte, que estão ao meu lado e confiam em mim desde o começo.

À minha irmã, Letícia, que é minha amiga e parceira na vida.

Aos meus primos, Emerson, Lucas e Davi, que são umas das minhas maiores alegrias.

Aos meus queridos avós, Isabel e Eduardo, Irapuan e José Manuel, que sempre abençoaram meus caminhos.

Aos meus tios e tias, em especial, minha tia Lilian, pelos incentivos e dedicação que sempre tiveram por mim.

Às minhas queridas amigas de infância, Natália Salvino e Emmyli Quézia, e minhas amigas da universidade, Lethícia Margarida e Otília Ricardo, a amizade de vocês tornou essa jornada possível, leve e divertida.

À Prof. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento, pela orientação, oportunidade e ensinamentos transmitidos.

A Dra. Otília Ricardo de Farias e Dra. Loise Araújo Costa pela participação na banca examinadora e valiosas contribuições.

A todos os professores da UFPB, pelos ensinamentos transmitidos ao longo da graduação.

À Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de realização da graduação.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a concretização desta importante etapa da minha vida.

*Obrigada!*

## RESUMO

A ocorrência de fungos em sementes de feijão-caupi resulta em perdas de produção significativas. Embora o controle químico seja amplamente utilizado para controlar patógenos em sementes, pode causar contaminação ambiental, danos à saúde de homem e animais. Nesse contexto, a microbiolização de sementes vem ganhando destaque como uma alternativa sustentável aos fungicidas sintéticos. Além disso, compreender a dinâmica populacional de um patógeno é crucial para prevenir sua disseminação e permitir o seu controle de forma eficaz. Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição geográfica de *Fusarium proliferatum* no Brasil, sua gama de hospedeiras e diferentes fontes de disseminação. Também avaliou o potencial de produtos a base de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão-caupi, bem como controle biológico de *F. proliferatum* associado a essa cultura. Para avaliação da dinâmica populacional do patógeno no Brasil utilizou-se uma abordagem filogeográfica utilizando o gene Translation Elongation Factor 1-alpha (TEF1- $\alpha$ ). Para avaliação do efeito dos produtos biológicos, sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, foram imersas em suspensões de EcoTrich® (*T. harzianum*), Quality® (*T. asperellum*), Pardella® (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*) e Shocker® (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens*). Foi realizado o tratamento das sementes com fungicida Captana (240g / 100 kg de sementes) e imersão em água destilada esterilizada (controle). A sanidade das sementes tratadas foi avaliada pelo *Blotter test*. Avaliaram-se também germinação e emergência. Determinou-se a taxa de transmissão de *F. proliferatum* através do contato direto entre as sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, com a colônia do patógeno. Foi realizado o teste *in vitro* de confronto direto e antibiose com *F. proliferatum*. Em casa de vegetação, determinou-se a incidência e severidade da doença em plantas tratadas. Os fungos associados às sementes de feijão-caupi foram: *Cladosporium* sp. (22,5%) *Fusarium* spp. (7,0%), *Aspergillus* sp. (7,0%), *Alternaria* sp. (2,0%), *Macrophomina* sp. (1,0%) e *Penicillium* sp. (1,0%). Observou-se redução da incidência dos fungos e incremento na qualidade fisiológica das sementes tratadas com produtos biológicos. *F. proliferatum* é patogênico e transmitido via sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã. A microbiolização reduz a incidência e severidade da doença e atua no crescimento das plântulas de feijão-caupi.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Vigna unguiculata* L.; controle biológico; patologia de sementes.

## ABSTRACT

The occurrence of fungi in cowpea seeds results in significant production losses. Although chemical control is widely used to manage pathogens in seeds, it can cause environmental contamination and harm to human and animal health. In this context, seed microbiolization has been gaining prominence as a sustainable alternative to synthetic fungicides. Additionally, understanding the population dynamics of a pathogen is crucial to prevent its spread and enable effective control. Thus, the objective of this study was to evaluate the geographical distribution of *Fusarium proliferatum* in Brazil, its host range, and different sources of isolation. It also assessed the potential of products based on *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, and *Bacillus amyloliquefaciens* on the sanitary and physiological quality of cowpea seeds, as well as the biological control of *F. proliferatum* associated with this crop. To evaluate the population dynamics of the pathogen in Brazil, a phylogeographic approach using the Translation Elongation Factor 1-alpha (TEF1- $\alpha$ ) gene was employed. For the evaluation of the effect of biological products, cowpea seeds, cv. Marataoã, were immersed in suspensions of EcoTrich® (*T. harzianum*), Quality® (*T. asperellum*), Pardella® (*T. harzianum*, *T. asperellum*, and *B. amyloliquefaciens*), and Shocker® (*T. harzianum* and *B. amyloliquefaciens*). Seed treatment with the fungicide Captan (240g / 100 kg of seeds) and immersion in sterilized distilled water (control) were performed. The health of the treated seeds was evaluated by the Blotter test. Germination and emergence were also assessed. The transmission rate of *F. proliferatum* was determined through direct contact between cowpea seeds, cv. Marataoã, and the pathogen colony. An in vitro test of direct confrontation and antibiosis with *F. proliferatum* was conducted. In the greenhouse, the incidence and severity of the disease in treated plants were determined. The fungi associated with cowpea seeds were: *Cladosporium* sp. (22.5%), *Fusarium* spp. (7.0%), *Aspergillus* sp. (7.0%), *Alternaria* sp. (2.0%), *Macrophomina* sp. (1.0%), and *Penicillium* sp. (1.0%). A reduction in the incidence of fungi and an increase in the physiological quality of seeds treated with biological products were observed. *F. proliferatum* is pathogenic and transmitted via cowpea seeds, cv. Marataoã. Microbiolization reduces the incidence and severity of the disease and promotes the growth of cowpea seedlings.

**KEYWORDS:** *Vigna unguiculata* L.; biological control; seed pathology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Distribuição de <i>Fusarium proliferatum</i> em diferentes localizações geográficas do Brasil.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 19 |
| Figura 2. Distribuição geográfica dos 18 haplótipos do gene TEF-1 $\alpha$ de <i>Fusarium proliferatum</i> no Brasil.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 20 |
| Figura 3. Rede de haplótipos baseada no gene TEF-1 $\alpha$ para <i>Fusarium proliferatum</i> usando PopArt com relação a localização geográfica. Os estados são diferenciados por cores e os tamanhos dos círculos indicam a frequência dos haplótipos. Os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos. As barras que cruzam os ramos ao longo das ramificações da rede indicam frequência de mutações. Barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento de mutação.....               | 21 |
| Figura 4. Rede de haplótipos baseada no gene TEF-1 $\alpha$ para <i>Fusarium proliferatum</i> usando PopArt com relação ao hospedeiro. Os hospedeiros são diferenciados por cores e os tamanhos dos círculos indicam a frequência dos haplótipos. Os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos. As barras que cruzam os ramos ao longo das ramificações da rede indicam frequência de mutações. Barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento de mutação.....                      | 22 |
| Figura 5. Rede de haplótipos baseada no gene TEF-1 $\alpha$ para <i>Fusarium proliferatum</i> usando PopArt com relação a fonte de disseminação. As fontes de disseminação são diferenciadas por cores e os tamanhos dos círculos indicam a frequência dos haplótipos. Os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos. As barras que cruzam os ramos ao longo das ramificações da rede indicam frequência de mutações. Barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento de mutação..... | 23 |
| Figura 1. Incidência de fungos em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 37 |
| Figura 2. Colônia em batata dextrose ágar (BDA) do isolado de <i>Fusarium</i> sp. FC-01 observadas em microscopia óptica.. Características morfológicas do isolado FC-01: B Macroconídios. C Microconídio. D Monofiálide. E Monofiálide duplo. F Monofiálide.....                                                                                                                                                                                                                                                | 43 |
| Figura 3. Árvore filogenética do gene TEF1- $\alpha$ do isolado do complexo de espécies <i>Fusarium proliferatum</i> . As cepas do ex tipo são enfatizadas em negrito. Apenas os valores de suporte do Bootstrap (MV $\geq$ 70) são exibidos nos nós. "*" Indica isolado de feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.). A árvore foi enraizada num ponto médio apenas para facilitar a visualização. A barra de escala representa o número estimado de substituições de nucleotídeos por sítio.....       | 44 |
| Figura 4. Sintomas em plântula de feijão-caupi inoculadas com <i>Fusarium proliferatum</i> (FC-01): (A) deterioração de sementes de feijão-caupi inoculadas com o isolado FC-01; (B) podridão do colo e crescimento micelial do isolado FC-01 em plântulas sintomáticas de feijão-caupi; (C) lesões em folhas cotiledonares e crescimento micelial do isolado FC-01.....                                                                                                                                         | 45 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Número de acesso do GenBank de <i>Fusarium proliferatum</i> utilizados nas análises.....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 16 |
| Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) entre sequências de <i>Fusarium proliferatum</i> em diferentes localizações geográficas do Brasil...                                                                                                                                                                                                                                          | 24 |
| Tabela 3. Resumo das estatísticas de diversidade genética de sequências de <i>Fusarium proliferatum</i> em diferentes localizações geográficas do Brasil...                                                                                                                                                                                                                                    | 25 |
| Tabela 1. Incidência de fungos (%) em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....                                                                                                                                                                           | 38 |
| Tabela 2. Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem de emergência (PCE), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ..... | 39 |
| Tabela 3. Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de plântulas de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> no teste de germinação.....                                                    | 40 |
| Tabela 4. Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSRA) de plântulas de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> no teste de emergência.....                                                   | 41 |
| Tabela 5. Classificação quanto ao antagonismo contra <i>Fusarium proliferatum</i> no teste de cultivo pareado com produtos biológicos comerciais.....                                                                                                                                                                                                                                          | 46 |
| Tabela 6. Ação de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> e <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> sobre o crescimento micelial, índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição (PIC) de <i>F. proliferatum</i> in vitro.....                                                                                           | 47 |
| Tabela 7. Incidência de <i>Fusarium proliferatum</i> em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos biológicos.....                                                                                                                                                                                                                                                          | 47 |
| Tabela 8. Comprimento de parte aérea (CPA) e plântulas sintomáticas de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos biológicos.....                                                                                                                                                                                                                                                       | 48 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>11</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>11</b> |
| 2.1. Importância do feijão-caupi.....                                                                                                                                                                     | 12        |
| 2.2. Qualidade de sementes.....                                                                                                                                                                           | 12        |
| 2.3. <i>Fusarium</i> associado a sementes e seu impacto na agricultura.....                                                                                                                               | 14        |
| 2.4. Controle biológico de <i>Fusarium</i> associado a sementes.....                                                                                                                                      | 15        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>16</b> |
| Diversidade genética e análises de rede.....                                                                                                                                                              | 18        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                                     | <b>18</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                                                  | <b>25</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>26</b> |
| <b>CAPÍTULO II <i>Fusarium</i> ASSOCIADO AO FEIJÃO-CAUPI: CARACTERIZAÇÃO E BIOCONTROLE.....</b>                                                                                                           | <b>28</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                                                                 | <b>29</b> |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>30</b> |
| 2.1. Local de condução dos experimentos.....                                                                                                                                                              | 30        |
| 2.2. Origem das sementes de feijão-caupi.....                                                                                                                                                             | 30        |
| 2.3. Qualidade sanitária de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                                       | 31        |
| 2.4. Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                                     | 31        |
| 2.5. Isolamento e identificação de <i>F. proliferatum</i> associado ao feijão-caupi.....                                                                                                                  | 32        |
| 2.6. Transmissão semente-planta de <i>F. proliferatum</i> em feijão-caupi.....                                                                                                                            | 33        |
| 2.7. Controle in vitro de <i>F. proliferatum</i> com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                                                    | 34        |
| 2.7.1. Pareamento de culturas.....                                                                                                                                                                        | 34        |
| 2.7.2. Metabólitos voláteis.....                                                                                                                                                                          | 34        |
| 2.8. Controle biológico de <i>F. proliferatum</i> inoculado em sementes de feijão-caupi com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....             | 35        |
| 2.9. Controle biológico de <i>F. proliferatum</i> em plântulas de feijão-caupi tratadas com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> via sementes..... | 35        |
| 2.10. Análise dos dados.....                                                                                                                                                                              | 36        |

|                                                                                                                                                                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                                                                           | <b>36</b> |
| 3.1. Qualidade sanitária de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                                             | 37        |
| 3.2. Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                                           | 39        |
| 3.3. Identificação de <i>Fusarium proliferatum</i> associado à murcha em feijão-caupi.....                                                                                                                      | 42        |
| 3.3.1. Caracterização morfológica.....                                                                                                                                                                          | 42        |
| 3.3.2. Identificação molecular de <i>F. proliferatum</i> .....                                                                                                                                                  | 43        |
| 3.4. Transmissão semente-planta de <i>F. proliferatum</i> em feijão-caupi.....                                                                                                                                  | 45        |
| 3.5. Controle in vitro de <i>F. proliferatum</i> com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                                                          | 46        |
| 3.5.1. Pareamento de culturas.....                                                                                                                                                                              | 46        |
| 3.5.2. Metabólitos voláteis.....                                                                                                                                                                                | 46        |
| 3.6. Controle de <i>F. proliferatum</i> inoculado em sementes de feijão-caupi com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> .....                             | 47        |
| 3.7. Controle biológico de <i>Fusarium proliferatum</i> em plântulas de feijão-caupi tratadas com produtos à base de <i>T. harzianum</i> , <i>T. asperellum</i> e <i>B. amyloliquefaciens</i> via sementes..... | 48        |
| <b>4. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>49</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                         | <b>50</b> |

## **CAPÍTULO I**

### **A FILOGEOGRAFIA E A ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL DE *Fusarium proliferatum***

## 1. INTRODUÇÃO

O fungo *Fusarium proliferatum* é um fitopatógeno amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais. Apresenta uma alta especificidade de hospedeiro, resultando em perdas significativas na produção, afetando a economia e a segurança alimentar (TORRES-CRUZ et al., 2022). Além disso, o *F. proliferatum* é conhecido por produzir metabólitos secundários tóxicos ou micotoxinas, que representam uma séria ameaça à segurança alimentar global para humanos e animais (KIM et al., 2020).

Dada a importância global de *Fusarium*, estudos sobre biologia de populações são de fundamental importância. A análise da diversidade genética e da estrutura populacional desse patógeno contribui para a compreensão de suas características e evolução, auxiliando na rápida e eficaz gestão de doenças e toxinas. Fatores como alto fluxo gênico e elevadas taxas de mutação podem permitir que as populações de patógenos superem barreiras genéticas dos hospedeiros (MCDONALD; LINDE, 2002).

Uma abordagem filogeográfica tem sido intensamente utilizada para investigar a diversidade genética de populações vegetais e animais, no entanto, investigações sobre fungos ainda são escassas. Filogeografia trata dos princípios e processos que regem as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente dentro e entre espécies estreitamente relacionadas, permitindo compreender a diversidade genética e a conexão com disseminação, de forma espacial e temporal (SANTOS et al., 2017). Estudos filogeográficos do *F. proliferatum* contribuem para uma melhor compreensão sobre sua distribuição, origem e diversidade genética, colaborando para um manejo mais eficaz desse patógeno e o estabelecimento das culturas (DAS et al., 2014).

Pouco se sabe sobre *F. proliferatum* além dos estudos voltados para a sua diversidade, deve-se a isso a falta de estudos avançados na identificação deste agente e do aprofundamento na abordagem quanto a dinâmica populacional desse patógeno. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição geográfica de *F. proliferatum* no Brasil, sua gama de hospedeiros e as diferentes fontes de isolamento.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Importância do feijão-caupi

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.; família Fabaceae, também conhecido popularmente como feijão-de-corda e feijão-macassar é adaptado a diversas condições edafoclimáticas, podendo ser cultivado em condições tropicais e subtropicais da África, Ásia e América do Sul. (ARRUDA et al., 2020). É uma das culturas mais tradicionais da agricultura brasileira, sendo amplamente cultivada nas regiões Norte e Nordeste e em áreas com características mais áridas no Centro-Oeste e no Sudeste (Mato Grosso e Minas Gerais) devido à rusticidade, especialmente em relação à demanda hídrica, adaptando-se bem às condições de baixa disponibilidade de água (CONAB, 2024). Também adapta-se bem às condições de baixa fertilidade do solo, capaz de fixar nitrogênio por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*, fácil cultivo e elevada capacidade produtiva, entre outras vantagens de produção (VALE et al., 2017).

De acordo com a Conab (2024), na safra de 2022/23, a cultura ocupou uma área de 1.209,0 mil ha, produtividade de 458,0 kg ha e produção de 554,6 mil t, com destaque para Bahia (116,8 mil t), Mato Grosso (79,2 mil t), Piauí (76,4 mil t), Ceará (59,4 mil t) e Tocantins (51,8 mil t). Na safra 2023/2024 estima-se que a cultura ocupe uma área de 1.249,7 mil ha, produtividade de 495 kg ha e produção de 619,2 mil. t.

O feijão-caupi desempenha importante papel na segurança alimentar, nutrição humana e agricultura de subsistência (OMOIGUI et al., 2018). É cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, e para o consumo humano, *in natura*, na forma de conserva ou desidratado (ROCHA et al., 2017). Segundo Frota et al. (2008), possui alto teor de proteína (23% a 25% em média), aminoácidos essenciais, carboidratos (62% em média), fibras, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2% em média), vitaminas do complexo B e minerais como ferro e cálcio, sendo fundamental para a promoção da saúde e prevenção de doenças, constituindo um alimento básico para as populações de baixa renda do Nordeste brasileiro.

A diversidade genética do feijão-caupi contribui para a adaptação das plantas às mudanças climáticas e para a manutenção da segurança alimentar em regiões vulneráveis (FAO, 2020). Também pode ser utilizada como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e ainda como adubação verde e proteção do solo (ROCHA et al., 2017).

## 2.2. Qualidade de sementes

A maior parte das culturas são propagadas por semente e, sendo as mesmas consideradas um dos principais insumos, sua qualidade é um fator importante, estando diretamente relacionada ao bom desempenho da lavoura (GAUR et al., 2020). A utilização de sementes de baixa qualidade é responsável por danos significativos ao feijão-caupi (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2020) e essa qualidade é expressa pelos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários (PESKE et al., 2012). A qualidade sanitária é avaliada pela presença ou ausência de infestação por insetos e/ou infecção/infestação de patógenos (GAUR et al., 2020).

O fato de microrganismos estarem presentes nas sementes, não significa que os mesmos são patogênicos. Além disso, elevados índices de germinação, vigor, pureza física e genética não garantem uma alta qualidade das sementes. É importante avaliar outros atributos sanitários ao longo do cultivo, sendo de fundamental importância para evitar a disseminação de patógenos e o estabelecimento em áreas de cultivos (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2020).

O inóculo presente nas sementes é facilmente disseminado e introduzido em áreas isentas, podendo determinar o ciclo inicial da doença e infestar, de forma definitiva, o campo de cultivo (CHALAM et al., 2020). Além disso, sementes são eficientes meios de sobrevivência para os patógenos, uma vez que são propágulos que apresentam maior viabilidade no tempo quando comparados com outras partes vegetais de propagação (MACHADO, 2012).

Os fungos associados às sementes podem ser classificados como de campo e de armazenamento. Os fungos de campo estão presentes naturalmente quando as sementes apresentam elevado teor de água (acima de 20%), sob umidade relativa do ar superior a 95%. Por sua vez, os fungos de armazenamento, abordam principalmente os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, associam-se às sementes durante operações de colheita, transporte e beneficiamento, e se manifestam durante o armazenamento, causando deterioração e, conseqüentemente, redução da germinação e vigor. Estes requerem uma menor quantidade de água (em torno de 14%) e uma umidade relativa do ar superior a 80% (MARCOS FILHO, 2005; ATHAYDE SOBRINHO et al., 2020).

As áreas cultivadas com feijão-caupi podem ser infestadas por fungos transmitidos via sementes, sendo considerados uns dos principais entraves à sua produção (REGO et al., 2020). As sementes podem ser infectadas antes da germinação, com redução ou eliminação da capacidade de germinação, resultando em baixa porcentagem de emergência de plântulas (MUKHTAR, 2009). Muitos patógenos transmitidos por sementes tornam-se ativos quando as

sementes são semeadas, o que pode resultar em tombamento, podridão radicular, mancha foliar ou podridão do caule, murcha e morte, resultando em grandes perdas econômicas (ADDRAH et al., 2020). Nesse sentido, várias espécies de *Fusarium* podem causar sintomas severos em diversas espécies de plantas cultivadas (FARIAS et al., 2022).

### **2.3. *Fusarium* associado à sementes e seu impacto na agricultura**

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link em 1809. Atualmente pertence ao Filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e ordem Hypocreales. Este fungo apresenta micélio e conidióforos hialinos, os quais dão origem a dois tipos de conídios: macroconídios e microconídios. Os macroconídios com um ou vários septos transversais, hialinos, fusóides, acrógenos e frequentemente pedicelados. Os microconídios também hialinos, geralmente sem septos, produzidos isoladamente, formados em falsas-cabeças unidas e/ou em cadeias (LESLIE; SUMMERREL, 2006).

Espécies de *Fusarium* são comumente relatadas como endófitas, epífitas, saprófitas e/ou patógenos de várias culturas economicamente importantes, estando distribuídos em todo o mundo (LESLIE; SUMMERELL, 2006). O gênero *Fusarium* é favorecido quando o plantio é realizado em locais com temperaturas entre 25 °C e 30 °C, em solos leves, arenosos, ácidos e úmidos (SINGH et al., 2007). Na ausência das condições ideais para o desenvolvimento da doença, algumas espécies de fungo sobrevivem através de estruturas de resistência conhecidas como clamidósporos, ou ainda, em estruturas internas das sementes, como no embrião (RAMOS et al., 2014). Os conídios têm vida curta, no entanto, os clamidósporos podem permanecer viáveis por muitos anos (CHAND et al., 2009).

Esse patógeno é amplamente disseminado de um campo para outro, a longas distâncias, principalmente por sementes infectadas e/ou infestadas. A disseminação é facilitada pelo vento e água de irrigação, que carregam conídios e solos infestados a partir de implementos agrícolas contaminados (TOLEDO-SOUZA et al., 2012). Após a penetração, as hifas do fungo são capazes de colonizar a célula da planta, atingindo o seu sistema vascular, especificamente os vasos do xilema. O fungo coloniza os vasos, até a doença atingir estádios mais avançados de desenvolvimento, levando à morte do hospedeiro (DALLA PRIA; SILVA, 2010).

A murcha de *Fusarium* é causada por várias espécies do gênero, e ocorre na maioria das áreas onde o feijão-caupi é cultivado (AIGBE et al., 1999; SHRESTHA et al., 2016a; SHRESTHA et al., 2016b; FARIAS et al., 2022). Os sintomas característicos dessa doença

são redução do crescimento, escurecimento de feixe vascular, sintomas graduais de amarelecimento e murchamento, queda de folhas, resultando na morte da planta infectada (NECHET; VIEIRA, 2006).

Oliveira et al. (2021) verificaram a presença de diversas espécies de *Fusarium* em sementes de feijão-caupi no Brasil, sendo responsável pela redução na qualidade e germinação das sementes, bem como, ocorrência de deterioração durante o armazenamento e transmissão de doenças para as plantas adultas, ocasionando danos significativos nas lavouras.

#### **2.4. Controle biológico de *Fusarium* associados às sementes**

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido, de forma geral, como "a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocadas por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem" (COOK; BAKER, 1983). De forma simplificada, é a utilização de um microrganismo não patogênico para controlar outro microrganismo patogênico (MEDEIROS et al., 2018).

Os agentes com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos são chamados de antagonistas. Esses antagonistas podem atuar através de diversos mecanismos de ação direto e/ou indireto sobre o patógeno e, geralmente, o microrganismo possui mais de um mecanismo, o que garante um amplo espectro de ação. Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são a antibiose, competição, parasitismo, predação, promoção de crescimento e indução de resistência (BENÍTEZ et al., 2004; SANTOS et al., 2012; ABDELRAHMAN et al., 2016; FARIAS et al., 2019).

As principais formas de aplicação de produtos biológicos no controle de doenças de plantas são através do tratamento de sementes, sulco de plantio, pulverização da parte aérea e na água de irrigação e dependem da natureza da doença, das especificações das formulações e da fase do ciclo da planta. Considerando a murcha de *Fusarium*, o tratamento de sementes é o mais indicado (MEDEIROS et al., 2018).

Os antagonistas apresentam velocidade de crescimento alta, e são capazes de se estabelecer no solo rapidamente e controlar diversos patógenos, sobretudo aqueles habitantes de solo (MELO et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado a eficiência desses antagonistas no tratamento de sementes para controle de *Fusarium* spp.. Milanesi et al. (2013) testaram a eficiência de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja (*Glycine max* L.). Jansson et al. (2020) avaliaram a eficácia de *Trichoderma harzianum* e de *Bacillus subtilis* como uma estratégia promissora na redução

da incidência de *Fusarium* spp. em sementes de diferentes plantas (*Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Glycine max*, *Lactuca sativa*, *Daucus carota*, *Fragaria chiloensis*, *Coffea arabica* e *Solanum lycopersicum*), mostrando o potencial de uso do controle biológico na patologia de sementes. Farias et al. (2019) observaram uma redução significativa da incidência e severidade da murcha de *Fusarium*, causado por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) tratadas com produtos biológicos à base de *Trichoderma* e *Bacillus* aplicados em sementes. Ferrigo et al. (2020) também constataram a capacidade de *T. harzianum* no controle de *F. verticillioides* e *F. graminearum* associados às sementes de milho. González-Núñez et al. (2021) abordaram diferentes estratégias de controle biológico de *Fusarium* em sementes.

Em feijão-caupi, Cruz (2021) verificou a eficácia de *Trichoderma* spp., proveniente do bioma Mata Atlântica, no controle de murcha do *Fusarium*. Os isolados testados apresentaram produção de metabólitos voláteis, não voláteis, atividade de micoparasitismo e inibição na germinação de conídios, sendo eficientes na redução da incidência e severidade da doença. Cruz et al. (2022) constataram que a microbiolização de sementes de feijão-caupi, cv. BRS Gurguéia, com *T. asperellum* e *T. harzianum* (Trichodermax<sup>®</sup>, Quality<sup>®</sup>, Trichodermil<sup>®</sup>, Agroguard<sup>®</sup> e Ecotrich<sup>®</sup>) reduziu eficientemente a incidência de *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Macrophomina* sp., apresentando atividade antimicrobiana semelhante ao fungicida sintético.

Zhang et al. (2021) verificaram que o uso combinado do agente de biocontrole *T. asperellum* SC012 e o fungicida Hymexazol foi capaz de controlar a murcha de *Fusarium* no feijão-caupi e reduzir significativamente os impactos gerados pelo uso desse produto, sendo esta uma forma ecologicamente correta e parte importante do controle integrado da murcha de *Fusarium* no feijão-caupi.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo das populações de *F. proliferatum* no Brasil foram realizadas utilizando 56 sequências em diferentes localizações geográficas, hospedeiros e diferentes fontes de isolamento. Esses conjuntos de dados foram compilados a partir de sequências de TEF-1 publicadas anteriormente e recuperadas do GenBank (Tabela 1).

**Tabela 1. Número de acesso do GenBank de *Fusarium proliferatum* utilizados nas análises.**

| Isolado | Localização | Hospedeiro | Isolamento | Tef |
|---------|-------------|------------|------------|-----|
|---------|-------------|------------|------------|-----|

|          |                    |                             |         |            |
|----------|--------------------|-----------------------------|---------|------------|
| FC-01    | Paraíba            | <i>Vigna unguiculata</i>    | Semente | MN784814.1 |
| CML 3548 | Piauí              | <i>Saccharum</i> sp.        | Folhas  | MH187918   |
| CML 3572 | Piauí              | <i>Saccharum</i> sp.        | Folhas  | MH187919   |
| CML 4126 | Minas Gerais       | <i>Saccharum</i> sp.        | Folhas  | MW455485   |
| CML 4202 | Minas Gerais       | <i>Saccharum</i> sp.        | Folhas  | MW455486   |
| CML 4203 | Minas Gerais       | <i>Saccharum</i> sp.        | Folhas  | MW455487   |
| CML 3138 | Rio Grande do Sul  | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423127   |
| CML 3139 | Rio Grande do Sul  | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423128   |
| CML 3644 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Planta  | LS423143   |
| CML 3645 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Planta  | LS423144   |
| CML 3646 | Santa Catarina     | <i>Oryza sativa</i>         | Planta  | LS423145   |
| CML 3647 | Rio Grande do Sul  | <i>Oryza sativa</i>         | Planta  | LS423146   |
| CML 3685 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423168   |
| CML 3686 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423169   |
| CML 3687 | Goiás              | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423170   |
| CML 3688 | Santa Catarina     | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423171   |
| CML 3741 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423175   |
| CML 3772 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423179   |
| CML 3775 | Santa Catarina     | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423182   |
| CML 3781 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423188   |
| CML 3782 | Goiás              | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423189   |
| CML 3786 | Goiás              | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423193   |
| CML 3794 | Mato Grosso        | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423201   |
| CML 3796 | Goiás              | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423203   |
| CML 3802 | Goiás              | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423209   |
| CML 3813 | Santa Catarina     | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423220   |
| CML 3815 | Santa Catarina     | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423222   |
| CML 3821 | Tocantins          | <i>Oryza sativa</i>         | Semente | LS423227   |
| UFSM-F8  | Rio Grande do Sul  | <i>Carya illinoensis</i>    | Semente | KF022239   |
| UFSM-F9  | Rio Grande do Sul  | <i>Carya illinoensis</i>    | Semente | KF022240   |
| UFSM-F11 | Rio Grande do Sul  | <i>Carya illinoensis</i>    | Semente | KF022241   |
| CML 3052 | Mato Grosso do Sul | <i>Urochloa decumbens</i>   | Semente | MT901360   |
| CML 3038 | Minas Gerais       | <i>Brachiaria brizantha</i> | Semente | MT901359   |

|            |                    |                               |         |          |
|------------|--------------------|-------------------------------|---------|----------|
| CML 3036   | Mato Grosso do Sul | <i>Brachiaria brizantha</i>   | Semente | MT901358 |
| F1264      | Paraná             | <i>Triticum</i> sp.           | Grão    | MN958250 |
| F1263      | Paraná             | <i>Triticum</i> sp.           | Grão    | MN958249 |
| F1043      | Paraná             | <i>Triticum</i> sp.           | Grão    | MN958244 |
| F963       | Paraná             | <i>Triticum</i> sp.           | Grão    | MN958240 |
| COUFAL0221 | Pernambuco         | <i>Napalea cochenillifera</i> | Raquete | MK640223 |
| FSJA4/A2-3 | Bahia              | <i>Passiflora</i> sp.         | Fruto   | KX185814 |
| SLVA3      | Bahia              | <i>Passiflora</i> sp.         | Fruto   | KX185812 |
| A66-2B     | Bahia              | <i>Passiflora</i> sp.         | Semente | KX185806 |
| A66-3      | Bahia              | <i>Passiflora</i> sp.         | Semente | KX185805 |
| FP139      | Bahia              | <i>Passiflora</i> sp.         | Fruto   | KX185795 |
| FP133      | Bahia              | <i>Passiflora</i> sp.         | Fruto   | KX185790 |
| 14BA       | Bahia              | <i>Zea mays</i>               | Grão    | GU989188 |
| 36BA       | Bahia              | <i>Zea mays</i>               | Grão    | GU989187 |
| MRC8550    | São Paulo          | <i>Sorghum</i> sp.            | Semente | GU564309 |

### Diversidade genética e análises de rede

As sequências de TEF-1 foram alinhadas utilizando a versão online do MAFFT 7 (KATO; TOH, 2013, KATO et al., 2019) usando o método de refinamento iterativo G-INS-i e a matriz de pontuação de nucleotídeos 200PAM/k = 2. As lacunas externas foram aparadas no MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). Índices de diversidade molecular, incluindo número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H), diversidade de haplótipos (Hd; NEI, 1987) e diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ; NEI, 1987) foram estimados com DnaSP v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A estrutura genética foi estimada para cada localidade amostrada (diversidade genética dentro e entre localidades) e a análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada no software ARLEQUIN v.3.1 (EXCOFFIER et al., 2007). AMOVA foi utilizada para estimar a estrutura genética usando informações do conteúdo alélico do haplótipo, bem como suas frequências.

Uma rede de haplótipos para visualizar a relação genética entre haplótipo e populações geográficas, a gama de hospedeiros, bem como fontes de isolamento foram geradas por um método de junção mediana (MJ) no PopART (LEIGH; BRYANT, 2015). Para relacionar as relações filogeográficas dos haplótipos, foi realizada a plotagem em mapas geográficos a

frequência de cada haplótipo obtido, utilizando o software Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems, EUA).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *F. proliferatum* identificados no Brasil variaram quanto ao hospedeiro e à sua distribuição geográfica. Essa espécie foi identificada causando doenças em culturas de grande importância econômica, como feijão-caupi, arroz, milho, trigo, sorgo, girassol, maracujá e cana-de-açúcar, estando distribuído em 13 estados brasileiro (Figura 1).

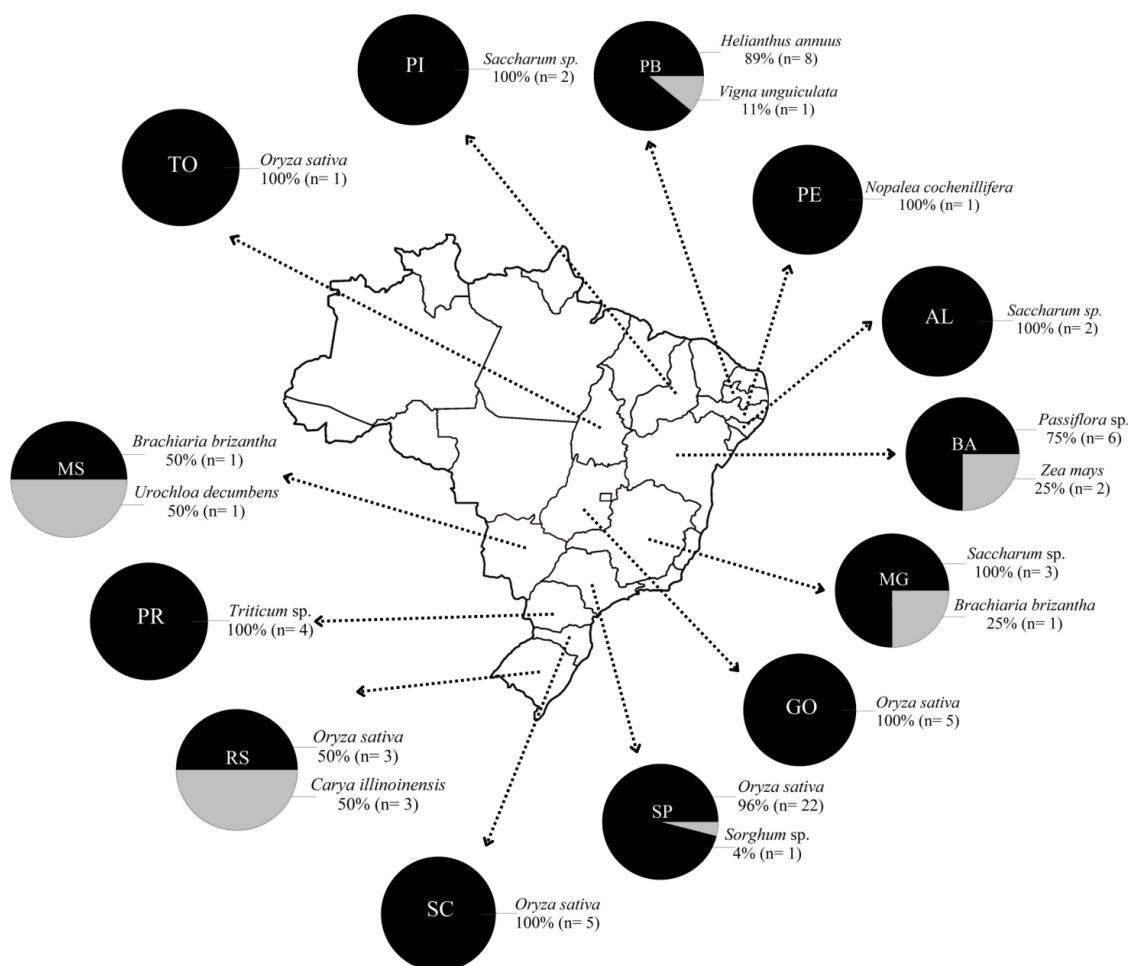
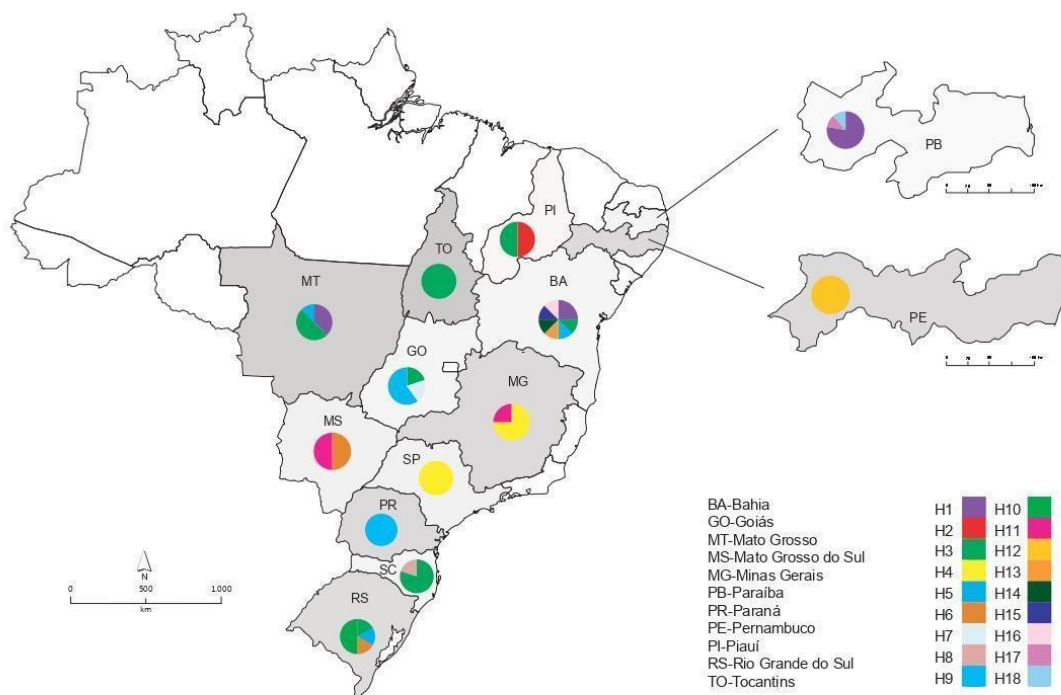


Figura 1. Distribuição de *Fusarium proliferatum* em diferentes localizações geográficas do Brasil.

Nas 56 sequências obtidas foram observados 18 haplótipos, sendo o haplótipo “H3” o mais frequente nas localidades geográficas em estudo, estando presente no Piauí, Tocantins, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, seguido pelo “H1” e “H9”. Observou-se onze haplótipos únicos (H2, H6, H7, H8, H12, H13, H14, H15, H16, H17 e H18), ou seja, foram identificados apenas uma vez e, portanto, exclusivos da localidade amostrada (Figura 2).



**Figura 2. Distribuição geográfica dos 18 haplótipos do gene TEF-1 $\alpha$  de *Fusarium proliferatum* no Brasil.**

Foi obtida três redes contendo todos os 18 haplótipos para o gene TEF-1 $\alpha$  distribuídos com relação a localização geográfica (Figura 3), hospedeiros (Figura 4) e fonte de isolamento (Figura 5).

O procedimento de estimativa detectou três nós (representados por círculos pretos menores), esses representam haplótipos extintos ou não amostrados. Os haplótipos ancestrais são os que ocupam o centro da rede, nesse caso, o “H3” é considerado o mais ancestral. Com relação à localização geográfica, o “H3” estava presente em sete localidades (Mato Grosso, Santa Catarina, Goiás, Tocantins, Bahia, Piauí e Rio Grande do Sul) das treze amostradas (Figura 3). Com relação ao hospedeiro, o “H3” foi observado com mais frequência em *Oryza sativa*, seguido por *Saccharum* sp. e *Passiflora edulis* (Figura 4). E com relação a fonte de

isolamento, o mesmo foi detectado com mais frequência em sementes, seguido por planta e folhas (Figura 5).

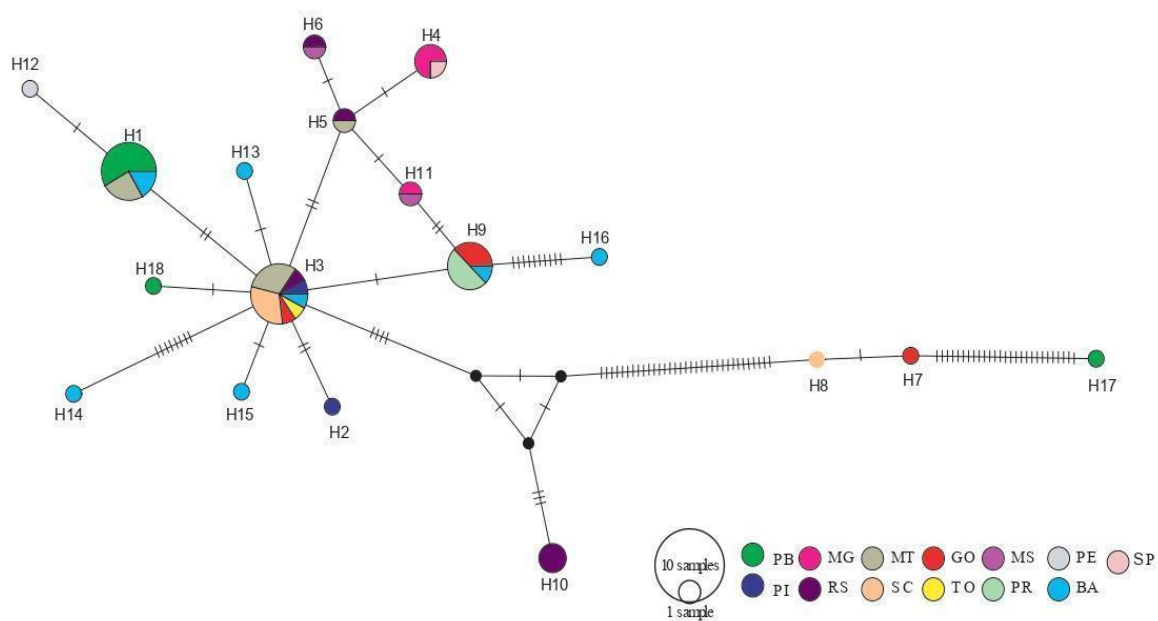


Figura 3. Rede de haplótipos baseada no gene *TEF-1 $\alpha$*  para *Fusarium proliferatum* usando PopArt com relação a localização geográfica. Os estados são diferenciados por cores e os tamanhos dos círculos indicam a frequência dos haplótipos. Os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos. As barras que cruzam os ramos ao longo das ramificações da rede indicam frequência de mutações. Barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento de mutação.

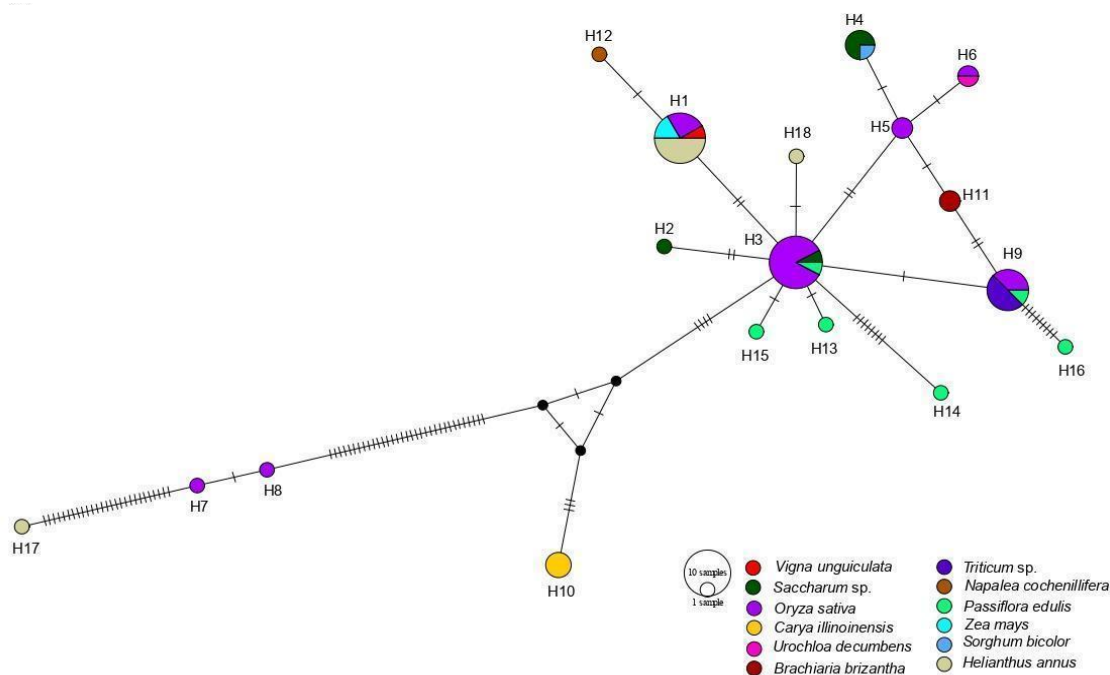
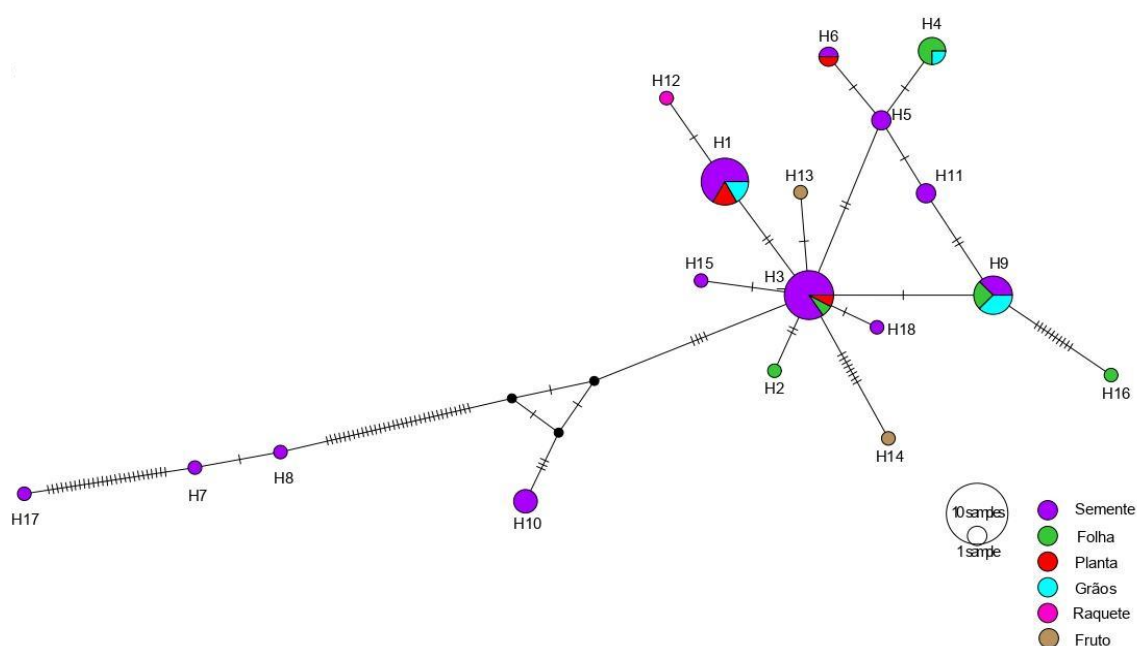


Figura 4. Rede de haplótipos baseada no gene *TEF-1 $\alpha$*  para *Fusarium proliferatum* usando PopArt com relação ao hospedeiro. Os hospedeiros são diferenciados por cores e os tamanhos dos círculos indicam a frequência dos haplótipos. Os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos. As barras que cruzam os ramos ao longo das ramificações da rede indicam frequência de mutações. Barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento de mutação.



**Figura 5.** Rede de haplótipos baseada no gene *TEF-1α* para *Fusarium proliferatum* usando PopArt com relação a fonte de isolamento. As fontes de isolamento são diferenciadas por cores e os tamanhos dos círculos indicam a frequência dos haplótipos. Os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos. As barras que cruzam os ramos ao longo das ramificações da rede indicam frequência de mutações. Barras individuais que cruzam os ramos representam um único evento de mutação.

O “H3” também foi o mais frequente e apresentou ramificações para haplótipos que ocuparam toda rede, reforçando a evidência de sua ancestralidade. A presença de ramificações é algo esperado em redes, pois esses haplótipos sofrem várias mutações em momentos diferentes, gerando vários haplótipos descendentes, que por sua vez, também sofrem mutações. Os haplótipos que ocupam as pontas da rede são os mais recentes (TEMPLETON et al., 1992). Além desse, os outros dois haplótipos mais frequentes foram “H1” e “H5”, sendo encontrados em muitos locais amostrados.

De acordo com a Teoria da Coalescência (KINGMAN, 1982) é esperado que o haplótipo ancestral esteja presente na maioria das localizações geográficas, enquanto novos haplótipos têm uma distribuição mais restrita. Assim, a distribuição observada reforça as evidências mencionadas acima, que o haplótipo “H3” é provavelmente o ancestral e os haplótipos com distribuição mais restrita são os descendentes.

Em geral, a diversidade para a maioria das localidades deste estudo pode estar relacionada com a disseminação do patógeno, sendo mais frequente através de sementes. A distribuição geográfica, ampla gama de hospedeiros e forma de disseminação de *F.*

*proliferatum* constitui um sério problema para o manejo da doença ocasionada por esse patógeno.

Houve diferença significativa dentro das populações de *F. proliferatum* amostradas (Tabela 2).

**Tabela 2. Análise de variância molecular (AMOVA) entre sequências de *Fusarium proliferatum* em diferentes localizações geográficas do Brasil.**

| Fonte                 | d.f. | Soma dos quadrados | Componentes de variação | Variação (%) | FST    |
|-----------------------|------|--------------------|-------------------------|--------------|--------|
| Entre populações      | 12   | 57,049             | 0,295                   | 7,74         | 0,077* |
| Dentro das populações | 43   | 151,522            | 3,523                   | 92,26        |        |
| Total                 | 55   | 208,571            | 3,819                   |              |        |

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

A diversidade haplotípica (Hd) variou de 0,00 a 1. O valor inferior (0,00), atribuído aos estados Tocantins, Paraná, Pernambuco e São Paulo. Por outro lado, valores aproximados a 1 foram observados em populações onde todos os haplótipos eram distintos, ou seja, alta diversidade genética dentro da localidade. Os estados do Piauí e Mato Grosso do Sul apresentaram altos valores de diversidade apresentando apenas dois haplótipos altamente distintos. (Tabela 3).

Para a diversidade de nucleotídeos, locais que exibiram substancialmente a mesma frequência de haplótipos não têm necessariamente o mesmo valor, uma vez que a estimativa também leva em consideração a quantidade de mutação entre esses haplótipos. Por exemplo, o estado do Piauí (2 haplótipos) e Santa Catarina (2 haplótipos) tiveram a mesma proporção de haplótipos, no entanto, tiveram valores diferentes de diversidade haplotípica (Hd) (1 e 0,400, respectivamente) e de diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) (0,005 e 0,048, respectivamente). Por outro lado, Rio Grande do Sul (4 haplótipos) e Mato Grosso (3 haplótipos) tiveram valores diferentes de diversidade haplotípica (0,800 e 0,679, respectivamente) e mesmo valor de diversidade de nucleotídeos (0,018) (Tabela 3). Esses dados comprovam a alta diversidade genética entre os isolados avaliados de *F. proliferatum* distribuídos no Brasil.

**Tabela 3. Resumo das estatísticas de diversidade genética de sequências de *Fusarium proliferatum* em diferentes localizações geográficas do Brasil.**

| População | N  | S  | H  | Hd (SD)       | $\pi$ (SD)    |
|-----------|----|----|----|---------------|---------------|
| PB        | 9  | 46 | 3  | 0,417 (0,191) | 0,031 (0,021) |
| PI        | 2  | 2  | 2  | 1 (0,500)     | 0,005 (0,002) |
| MG        | 4  | 2  | 2  | 0,500 (0,265) | 0,003 (0,002) |
| RS        | 6  | 11 | 4  | 0,800 (0,172) | 0,018 (0,018) |
| MT        | 8  | 4  | 3  | 0,679 (0,122) | 0,018 (0,018) |
| SC        | 5  | 38 | 2  | 0,400 (0,237) | 0,048 (0,028) |
| GO        | 5  | 40 | 3  | 0,700 (0,218) | 0,049 (0,028) |
| TO        | 1  | 0  | 1  | 0,000 (0,000) | 0,000 (0,000) |
| MS        | 2  | 2  | 2  | 1 (0,500)     | 0,005 (0,002) |
| PR        | 4  | 0  | 1  | 0,000 (0,000) | 0,000 (0,000) |
| PE        | 1  | 0  | 1  | 0,000 (0,000) | 0,000 (0,000) |
| BA        | 8  | 23 | 7  | 0,964 (0,077) | 0,000 (0,000) |
| SP        | 1  | 0  | 1  | 0,000 (0,000) | 0,000 (0,000) |
| Total     | 56 | 80 | 18 | 0,881 (0,019) | 0,022 (0,058) |

N = N° de isolados dentro da população; S = número de sítios polimórficos; H = número de haplótipos;  $\pi$ =diversidade de nucleotídeos; DP =desvio padrão.

Essa alta diversidade pode ser atribuída a fluxo gênico, aumentando a diversidade dentro das populações, gerando polimorfismo e aumentando o tamanho efetivo da população e sua capacidade de resistir a mudanças aleatórias nas frequências genéticas, opondo-se à deriva genética e gerando novas combinações de genes, nas quais a seleção natural pode atuar (SANTOS et al., 2017).

## 5. CONCLUSÃO

*Fusarium proliferatum* possui diversidade de hospedeiros e ampla distribuição geográfica no Brasil;

As sementes é sua principal via de disseminação;

## REFERÊNCIAS

- Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). **Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms.** *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80-100.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2007). Arlequin (version 3.0): **an integrated software package for population genetics data analysis.** *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Katoh, K. & Toh, H. (2013) **MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.** *Molecular Biology and Evolution*, 30,772–780.
- Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K. D. (2019) **MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.** *Briefings in Bioinformatics*, 20, 1160–1166.
- Kim, H. S., Lohmar, J. M., Busman, M., Brown, D. W., Naumann, T. A., Divon, H. H., ... & Proctor, R. H. (2020). **Identification and distribution of gene clusters required for synthesis of sphingolipid metabolism inhibitors in diverse species of the filamentous fungus *Fusarium*.** *BMC genomics*, 21, 1-24.
- Kingman, J. F. (1982). **On the genealogy of large populations.** *Journal of Applied Probability*, 19(A), 27-43.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets.** *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.
- Leigh, J.W. & Bryant, D. (2015) **Popart: full-feature software for haplotype network construction.** *Methods Ecology Evolution*, 6, 1110–1116.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: **a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). **The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance.** *Euphytica*, 124, 163-180.
- Nei M (1987). **Molecular Evolutionary Genetics.** Columbia University Press, New York.
- Santos, P. H. D., Carvalho, B. M., Aguiar, K. P., Aredes, F. A. S., Poltronieri, T. P. S., Vivas, J. M. S., ... & Silveira, S. F. (2017). **Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection.** *Genetics and Molecular Research: GMR*, 16(2).
- Templeton, A. R. (1998). **Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history.** *Molecular Ecology*, 7(4), 381-397.

Torres-Cruz, T. J., Whitaker, B. K., Proctor, R. H., Broders, K., Laraba, I., Kim, H. S., ... & Geiser, D. M. (2022). **FUSARIUM-ID v. 3.0: an updated, downloadable resource for *Fusarium* species identification**. *Plant Disease*, 106(6), 1610-1616.

## CAPÍTULO II

### ***Fusarium* spp. ASSOCIADOS AO FEIJÃO-CAUPI: CARACTERIZAÇÃO E BIOCONTROLE**

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) é amplamente apreciado e cultivado em diversos países de regiões tropicais e subtropicais (ARRUDA et al., 2020). Essa cultura desempenha um papel crucial na segurança alimentar (OMOIGUI et al., 2018). No Brasil, é cultivado principalmente nas regiões Norte e Nordeste, além de áreas mais áridas do Centro-Oeste e Sudeste, como Mato Grosso e Minas Gerais, devido à sua alta rusticidade e capacidade de se adaptar a condições de baixa disponibilidade hídrica. Na safra 2022/23, o feijão-caupi ocupou uma área plantada de 1.209,9 mil hectares, com produtividade de 458,0 kg/ha e produção de 554,6 mil toneladas (CONAB, 2024).

Os plantios dessa cultura são frequentemente afetados por patógenos fúngicos transmitidos por sementes, considerados um dos principais entraves à sua produção (REGO et al., 2020). As sementes servem como um meio eficaz de sobrevivência e disseminação para a maioria desses patógenos (SILVA FLÁVIO et al., 2014). Mesmo em baixas taxas de infecção, a presença de certos patógenos nas sementes pode acarretar perdas significativas tanto em quantidade quanto em qualidade da produção (RODRIGUES; MENEZES, 2005).

Dentre os fungos que causam danos em sementes, a espécie *Fusarium proliferatum*, agente causal da murcha, é um dos principais e mais destrutivo patógeno do feijão-caupi. Os sintomas característicos da doença são redução do crescimento, escurecimento de feixe vascular, sintomas graduais de amarelecimento e murchamento, queda de folhas, resultando na morte da planta infectada. (NECHET; VIEIRA, 2006). Com isso, a utilização de sementes de qualidade é essencial para o sucesso da lavoura.

No geral, o controle de patógenos associados às sementes é realizado por meio da aplicação de produtos químicos. Contudo, o uso desses produtos tem causado uma série de problemas para a saúde humana, contaminação ambiental, perda da biodiversidade e resistência dos patógenos (CHIN et al., 2022). Como alternativa, é desejável a adoção de novas tecnologias com objetivo de otimizar a produção e que não causem efeitos adversos, a exemplo do uso do controle biológico de doenças (MARUYAMA et al., 2020).

Estudos têm revelado o potencial de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de patógenos associados às sementes em inúmeras culturas (FARIAS et al., 2019; CRUZ et al., 2020; CRUZ et al., 2022). Além do controle fitossanitário, o controle biológico via sementes

proporciona benefício adicional de aumento da germinação das sementes, emergência das plântulas e maior tolerância a estresse ambiental (SINGH et al., 2016; CHIN et al., 2022).

Os antagonistas podem suprimir doenças de plantas através de seus efeitos diretos sobre o patógeno com uma combinação de vários mecanismos de ação, incluindo competição por nutrientes e/ou espaço, antibiose associada à secreção de metabólitos secundários, enzimas e micoparasitismo (DINESH et al., 2018) ou pelos efeitos indiretos, com a capacidade de induzir a defesa das plantas contra os patógenos e pela promoção do crescimento vegetal (ZEILINGER et al., 2016). Também são caracterizados por serem tolerantes a substâncias tóxicas produzidas por outros microrganismos e a diferentes tipos de fungicidas sintéticos, podendo ser utilizados em combinação com os mesmos (DARYAEI et al., 2016).

Diante disso, a pesquisa objetivou avaliar o potencial antagônico de produtos biológicos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquifaciens* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão-caupi, além de seu efeito no controle biológico de *Fusarium proliferatum* associado a essa cultura.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local de condução dos experimentos**

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e Laboratório de Fitopatologia (LAFIT), pertencentes ao Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais (DFCA), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), Campus II, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), localizado no município de Areia, Paraíba.

### **2.2. Origem das sementes de feijão-caupi**

Foram utilizadas sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, oriundas de área de produção localizada no município de Areia, Paraíba (6°57 '50.7 "S 35°44' 24.4"W). As sementes foram beneficiadas manualmente, descartando as mal formadas e/ou infestadas por pragas (sementes parcial ou totalmente destruídas, com perfurações atingindo o embrião).

### 2.3. Qualidade sanitária de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*

As sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, foram tratadas com 1) EcoTrich® (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); 2) Quality® (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); 3) Pardella® (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); 4) Shocker® (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); 5) Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes), além do (6) Controle (sem tratamento – imersas em água destilada esterilizada – ADE). Para isso, foram utilizadas 200 sementes por tratamento (10 repetições de 20 sementes). As sementes microbiolizadas, através da imersão por 5 min, foram dispostas em placas de Petri contendo dupla camada de papel filtro previamente umedecido com ADE e incubadas por 7 dias.

Foi realizada a visualização e identificação dos fungos associados às sementes através das características morfológicas (SEIFERT et al., 2011). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de incidência de fungos.

### 2.4. Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*

As sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, foram submetidas aos tratamentos descritos no item 2.3. e realizados os seguintes testes:

**Germinação (G):** foi realizado conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Foram utilizadas 200 sementes por tratamento (4 repetições de 50 sementes). As sementes foram submetidas aos tratamentos biológicos através da imersão por 5 min, distribuídas em substrato de papel “Germitest”, umedecido com 2,5 vezes o peso do papel seco e incubadas em câmara de germinação do tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.), regulada a 30°C e fotoperíodo de oito horas. Após o semeio, os rolos de papel foram acondicionados em sacos plásticos transparentes, com a finalidade de evitar a perda de água por evaporação. As contagens de sementes germinadas foram realizadas diariamente do 5º ao 8º dia, contabilizando-se as plântulas normais.

**Primeira contagem de germinação (PCG):** foi conduzida conjuntamente com o teste de germinação, onde foram contabilizadas as sementes germinadas no 5º dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Índice de velocidade de germinação (IVG):** foi conduzido em conjunto com o teste de germinação, onde foi anotado diariamente o número de sementes germinadas. O índice foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962), sendo  $IVG = N1/D1 + N2/D2 + \dots + Nn/Dn$ , em que: IVG = índice de velocidade de germinação; G = número de plântulas normais computadas nas contagens; N = número de dias da semeadura à 1ª, 2ª... 8ª.

**Emergência (E):** foi realizado conforme prescrições das Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). Foram utilizadas 200 sementes por tratamento (4 repetições de 50 sementes). As sementes foram submetidas aos tratamentos biológicos através da imersão por 5 min e, semeadas em bandejas plásticas com dimensões de 66 x 33 x 6 cm, contendo areia lavada, previamente esterilizada e irrigadas através de duas regas diárias.

As contagens das plântulas emergidas (emissão dos cotilédones acima do solo) foi realizada do 5º ao 8º dia após a semeadura.

**Primeira contagem de emergência (PCE):** foi conduzida conjuntamente com o teste de emergência, computando-se as sementes emergidas no 5º dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

**Índice de velocidade de emergência (IVE):** foi conduzido em conjunto com o teste de emergência, onde foi anotado diariamente o número de plântulas emergidas. O índice foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962), sendo  $IVE = N1/D1 + N2/D2 + \dots + Nn/Dn$ , em que: IVE = índice de velocidade de emergência; G = número de plântulas normais computadas nas contagens; N = número de dias da semeadura à 1ª, 2ª... 8ª.

**Comprimento e massa seca de plântulas:** foram realizados após o teste de germinação e emergência. Com o auxílio de uma régua graduada em milímetros, foi avaliado o comprimento de parte aérea e raiz das plântulas normais. A parte aérea e o sistema radicular das plântulas, separadamente, foram colocadas em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65 °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Posteriormente, foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula<sup>-1</sup>.

## 2.5. Obtenção e identificação de *F. proliferatum* associado ao feijão-caupi

Foi utilizado isolado de *F. proliferatum* (FC-01) pertencente à Coleção de Fungos Fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia (LAFIT), obtido de plântulas de feijão-caupi infectadas e identificado por meio da amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o gene do fator de alongação (EF1) usando os iniciadores Fa + 7 e Ra + 6

(KARLSSON et al., 2016), tendo o número de acesso do GenBank MW655796. O sequenciamento foi realizado no Laboratory of Plant Virology and Laboratory of Mycology, do Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, pertencente à Universidade de Évora, localizada em Évora, Portugal.

Foi realizada a caracterização morfológica do isolado, sendo cultivado em meios nutritivos batata-dextrose-ágar (BDA) e syntetic-nutrient-poor-ágar (SNA) (NELSON et al., 1987).

A presença ou não de esporodóquios; tamanho (comprimento e a largura), formato e septação de microconídios e macroconídios (com base na medição de 15 estruturas); tipos de fíalides (monofíalide e/ou polifíalide); presença ou ausência de clamidósporos; microconídios em falsa cabeça e/ou cadeia foram examinados em meio SNA contendo folhas de cravo, incubados por um período de 10-14 dias.

A avaliação da pigmentação e taxa de crescimento da cultura foi realizada em meio BDA, incubadas por 7–10 dias. As características morfológicas do isolado foram identificadas usando os critérios de Leslie; Summerell (2006).

## **2.6. Transmissão semente-planta de *F. proliferatum* em feijão-caupi**

Para avaliar a transmissão semente-planta de *F. proliferatum* em feijão-caupi, cv. Marataoã, o isolado de *F. proliferatum* (FC-01) foi inoculado nas sementes através da técnica de condicionamento fisiológico desenvolvido por Sousa et al. (2008), na qual o isolado fúngico foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose- ágar) + manitol com potencial osmótico ajustado para  $-1,0$  MPa. As placas foram incubadas com fotoperíodo de 12 h, por 7 dias, até o crescimento micelial do isolado alcançar toda superfície do substrato.

As sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio (1% por 3 min), foram distribuídas sobre a colônia fúngica, permitindo que entrassem em contato com a cultura do patógeno, onde permaneceram incubadas a temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. As sementes do tratamento de controle foram adicionadas em substrato com o restritor hídrico, na ausência de *F. proliferatum* (FC-01). Transcorrido o período de incubação, as sementes foram distribuídas em vasos plásticos (5 L) a uma profundidade de 2 cm, contendo substrato comercial Brasplant® e vermiculita (2:1 v/v) esterilizados. Aos 30 dias foi calculada a porcentagem de plântulas sintomáticas e assintomáticas.

De cada plântula foram retirados dois fragmentos do feixe vascular (seccionando-se a plântula e retirando-se os fragmentos em locais com lesões), e realizada a assepsia do material em álcool 70% por 30 segundos, seguido por hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, lavadas duas vezes ADE e colocados em placas de Petri com meio BDA. O material foi incubado com fotoperíodo de 12h, por 7 dias. Foi considerada infectada a plântula na qual foi possível identificar as estruturas do patógeno sob o material vegetal.

## **2.7. Controle *in vitro* de *F. proliferatum* com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens***

### **2.7.1. Pareamento de culturas**

O teste de pareamento de culturas foi realizado através da metodologia proposta por Dennis e Webster (1971), com modificações. O patógeno foi repicado 2 dias antes da aplicação dos produtos em placas de Petri com meio BDA. Os produtos biológicos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* (item 2.3) foram reidratados com ADE de acordo com as instruções do fabricante, depois, 4 alíquotas de 5 µL da suspensão foram colocadas em quatro pontos equidistantes, a 5 cm de distância do disco de micélio do patógeno.

As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Foram realizadas a classificação do agrupamento dos antagonistas segundo Bell et al. (1982), onde a classe 1: Antagonista cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio; classe 2: Antagonista cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; classe 3: Antagonista ocupa aproximadamente metade da superfície do meio; classe 4: Antagonista cresce sobre 1/3 da superfície do meio; classe 5: Antagonista não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

### **2.7.2. Metabólitos voláteis**

Também foi avaliado a ação de metabólitos voláteis de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* (item 2.3) sobre *F. proliferatum* (FC-01). Para isto, um disco de BDA (5 mm de diâmetro) contendo os micélios do patógeno foi colocado no centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio BDA. Os produtos biológicos foram reidratados com ADE de acordo com as instruções do fabricante, depois foi retirada uma alíquota de 10 µL da

suspensão e adicionada no centro de outras placas de Petri contendo meio BDA. As bases das placas de Petri contendo o patógeno e a suspensão dos antagonistas foram ajustadas e vedadas com papel filme, de forma que as bases superiores fossem aquelas com o patógeno. As placas de Petri foram incubadas com fotoperíodo de 12h, por sete dias. O delineamento foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por duas placas de Petri.

Durante sete dias foi realizada, diariamente, a medição do diâmetro das colônias de *F. proliferatum* com uma régua milimetrada, em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco (5mm de diâmetro cada) repicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada a média. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), sendo,  $IVCM = \Sigma (D - D_a) / N$ , onde: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual da colônia;  $D_a$ = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação (OLIVEIRA, 1991).

Com os dados de crescimento micelial também foram calculadas a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno, sendo  $PIC = (C - T / C) \times 100$ , onde: PIC = porcentagem de inibição; C = crescimento radial do patógeno (mm) sozinho (controle); T = crescimento radial do patógeno (mm) sobre a influência dos isolados de *Trichoderma* sp. (BASTOS, 1997).

## **2.8. Controle biológico de *F. proliferatum* inoculado em sementes de feijão-caupi com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens***

As sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (1% por 3 min). O isolado de *F. proliferatum* (FC-01) foi inoculado nas sementes através da técnica de condicionamento fisiológico desenvolvida por Sousa et al. (2008), por 48h. Após a inoculação do patógeno, as sementes foram submetidas ao tratamento com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* (item 2.3).

As sementes foram dispostas em placas de Petri contendo dupla camada de papel de filtro previamente umedecido com ADE, incubadas por 7 dias. Em seguida, procedeu-se a visualização do patógeno com o auxílio de microscópios óptico e estereoscópico. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de incidência de *F. proliferatum* sobre as sementes.

## **2.9. Controle biológico de *F. proliferatum* em plântulas de feijão-caupi tratadas com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* via sementes**

As sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio (1% por 3 min) e inoculadas com *F. proliferatum* através da técnica de condicionamento fisiológico desenvolvida por Sousa et al. (2008).

Após a inoculação do patógeno, as sementes foram submetidas aos tratamentos com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* (item 2.3). As sementes tratadas foram distribuídas em vasos plásticos (5 L) a uma profundidade de 2 cm, contendo substrato comercial Brasplant® e vermiculita (2:1 v/v) esterilizados. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado.

Após 30 dias da semeadura, foi calculada a porcentagem de plântulas sintomáticas e assintomáticas. Em cada plântula foram retirados dois fragmentos do feixe vascular (seccionando-se a plântula e retirando-se os fragmentos em locais com lesões), e realizada a assepsia do material em álcool 70% por 30 segundos, seguido por hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, lavadas duas vezes ADE e colocados em placas de Petri com meio BDA. O material foi incubado a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 h, por sete dias. Foi considerada infectada a plântula na qual foi possível identificar as estruturas do patógeno sob o material vegetal.

A avaliação da severidade foi realizada avaliando-se sintomas externos e internos, com base em escala de notas variando de 0-5, sendo 0 para plântulas sadias (sem sintomas foliar e vascular); 1 - ao observar sintomas iniciais de murcha (amarelecimento) e descoloração vascular; 2 - ao observar 25% das folhas com murcha e descoloração vascular; 3 - ao observar até 50% das folhas com murcha e descoloração vascular; 4 - ao observar até 75% das folhas com murcha e descoloração vascular; 5 - ao observar plantas mortas.

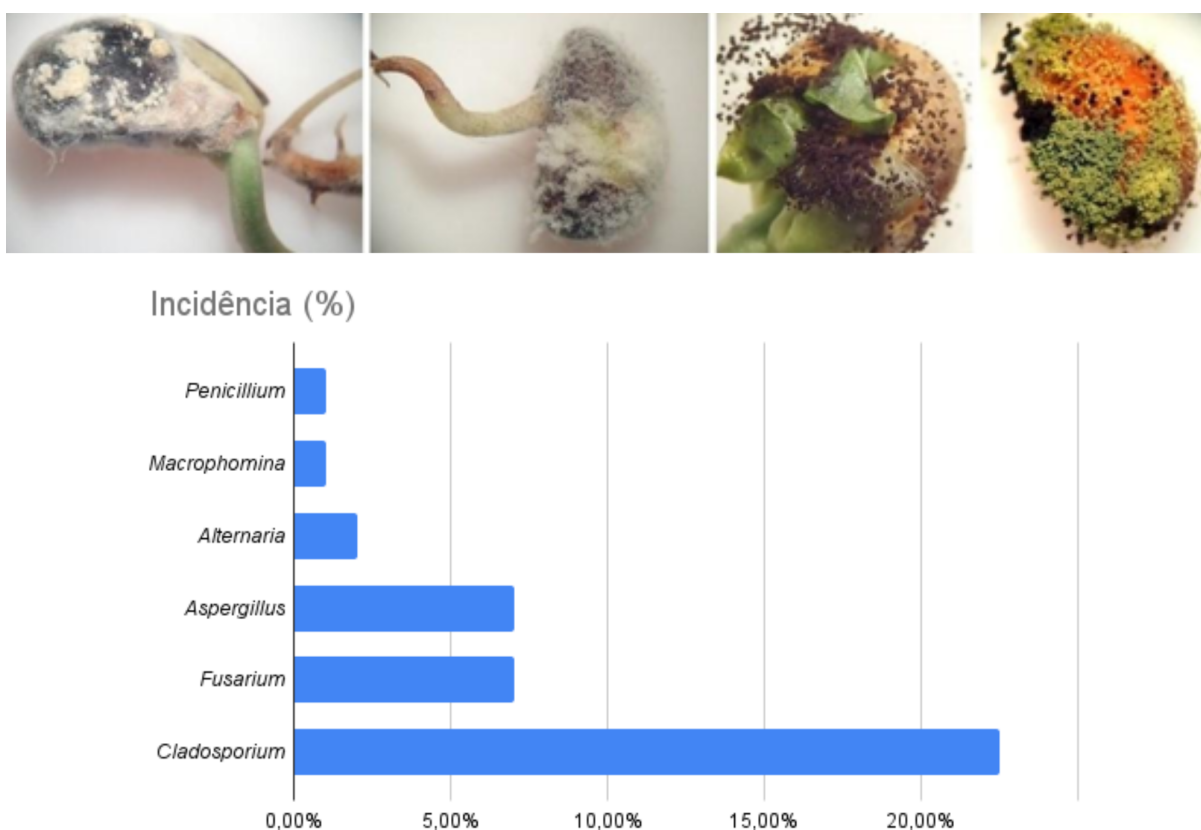
## **2.10. Análise dos dados**

Os resultados obtidos foram avaliados pelo software estatístico R (R CORE TEAM, 2020). As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Qualidade sanitária de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*

Os fungos identificados nas sementes feijão-caupi, cv. Marataoã, foram: *Cladosporium* (22,5%), *Fusarium* (7,0%), *Aspergillus* (7,0%), *Alternaria* (2,0%), *Macrophomina* (1,0%) e *Penicillium* (1,0%) (Figura 1).



**Figura 1. Incidência de fungos em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã.**

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* causam deterioração nas sementes e redução na germinação. Já *Macrophomina* provoca sintomas em caules, vagens e sementes, caracterizadas pela formação de pequenas manchas pretas na base do caule e nas raízes, assim como o escurecimento dos tecidos vasculares. *Alternaria* ocasionam deterioração de sementes e manchas pequenas, circulares e de coloração marrom clara nas folhas. *Cladosporium* produz manchas esverdeadas na superfície das sementes, principalmente no embrião, resultando na

sua deterioração. O gênero *Fusarium*, por sua vez, causa deterioração de sementes, tombamento de plântulas, apodrecimento das raízes e do caule, escurecimento vascular, lesões nas folhas e murcha da planta infectada (PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO, 2018). Todos esses sintomas acarretam perdas significativas na produção, tornando imprescindível o uso de sementes de qualidade e tratadas para o sucesso da lavoura.

Observou-se redução significativa da incidência dos fungos patogênicos nas sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com os produtos biológicos. Em comparação com a testemunha, verificou-se redução de 62,3% a 97,7% da incidência de *Cladosporium* nas sementes tratadas com produtos biológicos, com destaque para EcoTrich® (97,7%); redução de 57,1% a 92,0% da incidência de *Fusarium*, com destaque para EcoTrich® e Shocker® e; redução de 100% da ocorrência de *Aspergillus*, *Alternaria*, *Macrophomina* e *Penicillium* ao utilizar todos produtos biológicos no tratamento das sementes (Tabela 1).

**Tabela 1. Incidência de fungos (%) em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos a base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*.**

| Tratamentos | Incidência (%) |       |       |      |      |      |
|-------------|----------------|-------|-------|------|------|------|
|             | 1              | 2     | 3     | 4    | 5    | 6    |
| Testemunha  | 22,5a          | 7,0a  | 7,0a  | 2,0a | 1,5a | 1,0a |
| EcoTrich®   | 0,5c           | 0,5b  | 0,0b  | 0,0b | 0,0b | 0,0b |
| Quality®    | 8,5b           | 3,0b  | 0,0b  | 0,0b | 0,0b | 0,0b |
| Pardella®   | 4,0b           | 3,0b  | 0,0b  | 0,0b | 0,0b | 0,0b |
| Shocker®    | 3,5b           | 0,5b  | 0,0b  | 0,0b | 0,0b | 0,0b |
| Fungicida   | 1,0c           | 1,5b  | 1,5b  | 0,0b | 0,0b | 0,0b |
| CV (%)      | 20,38          | 17,67 | 16,85 | 5,95 | 4,48 | 5,32 |

1: *Cladosporium* sp., 2: *Fusarium* sp., 3: *Aspergillus* sp., 4: *Alternaria* sp., 5: *Macrophomina* sp., 6: *Penicillium* sp.. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich® (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); Quality® (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); Pardella® (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); Shocker® (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes).

A presente pesquisa demonstra que os produtos podem reduzir e até eliminar patógenos nas sementes. Isso ocorre devido ao amplo espectro de ação utilizados pelos antagonistas. O micoparasitismo, no qual o *Trichoderma* spp. pode parasitar diretamente os

patógenos, penetrando suas hifas nas paredes celulares, ocasionando a destruição do patógeno. *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. são capazes de competir por nutrientes e espaço, reduzindo os recursos disponíveis, além de produzir metabólitos que inibem a reprodução dos fungos fitopatogênicos. Esses antagonistas ainda contribuem ativando mecanismos de defesas naturais que protegem a planta contra a infecção de patógenos. (CACIARA et al., 2014)

O controle biológico está, atualmente, no centro das atenções globais e o seu uso permite diversificar as estratégias de manejo de doenças na agricultura, contribuindo para a redução do uso de produtos sintéticos. Isso o torna uma ferramenta essencial no manejo integrado de doenças, promovendo uma agricultura sustentável. Portanto, é fundamental garantir a disponibilidade de produtos biológicos eficazes e de alta qualidade.

### **3.2. Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi tratadas com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens***

Houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados para primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G) e índice de velocidade (IVG), quando comparados a testemunha. Para PCG os melhores resultados foram obtidos com uso do Quality® e Shocker®, com valores de 86% e 84%, respectivamente, não diferindo do fungicida. Para G e IVG, os melhores desempenhos foram constatados com Shocker®, com valores de 91% e 7,8%, respectivamente, não diferindo do fungicida. Não houve diferença entre os tratamentos para variáveis avaliadas no teste de emergência (PCE, E e IVE) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem de emergência (PCE), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens*.

| Tratamentos           | PCG (%) | G (%) | IVG  | PCE (%) | E (%) | IVE  |
|-----------------------|---------|-------|------|---------|-------|------|
| Testemunha            | 60d     | 60c   | 5,0d | 59a     | 61a   | 4,6a |
| EcoTrich <sup>®</sup> | 72c     | 74b   | 6,3c | 72a     | 72a   | 4,0a |
| Quality <sup>®</sup>  | 86a     | 86b   | 6,1c | 72a     | 72a   | 5,3a |
| Pardella <sup>®</sup> | 80b     | 80b   | 6,9b | 72a     | 72a   | 4,6a |
| Shocker <sup>®</sup>  | 84a     | 91a   | 7,8a | 75a     | 75a   | 4,7a |
| Fungicida             | 94a     | 94a   | 7,6a | 80a     | 80a   | 5,0a |
| CV (%)                | 7,05    | 7,48  | 5,89 | 14,82   | 14,82 | 9,63 |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); Shocker<sup>®</sup> (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes).

No teste de germinação, com relação ao comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CRA), o tratamento com Shocker<sup>®</sup> resultou em um aumento significativo quando comparados aos demais tratamentos, com valor médio de 7,2 cm e 8,3 cm, respectivamente. O tratamento das sementes com Pardella<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup> proporcionaram as melhores médias para massa seca de raiz (MSR), diferindo do tratamento controle e não diferindo do fungicida. Não houve diferença entre os tratamentos para variável massa seca da parte aérea (MSPA) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) de plântulas de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens* no teste de germinação.

| Tratamentos | CPA<br>----- cm ----- | CRA<br>----- cm ----- | MSPA<br>----- g ----- | MSRA<br>----- g ----- |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|-------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|

|                       |       |       |        |        |
|-----------------------|-------|-------|--------|--------|
| Testemunha            | 4,6b  | 5,3b  | 0,038a | 0,021b |
| EcoTrich <sup>®</sup> | 5,3b  | 6,4b  | 0,053a | 0,025b |
| Quality <sup>®</sup>  | 5,5b  | 6,5b  | 0,045a | 0,023b |
| Pardella <sup>®</sup> | 5,4b  | 5,8b  | 0,043a | 0,029a |
| Shocker <sup>®</sup>  | 7,2a  | 8,3a  | 0,058a | 0,030a |
| Fungicida             | 5,4b  | 8,1a  | 0,042a | 0,029a |
| CV (%)                | 15,14 | 14,03 | 18,27  | 12,21  |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); Shocker<sup>®</sup> (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes).

No teste de emergência, os tratamentos das sementes com EcoTrich<sup>®</sup>, Pardella<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup> foram os que proporcionaram melhores desempenhos no crescimento da parte aérea (CPA), diferindo do fungicida. Os melhores resultados para comprimento de raiz (CRA) foram observados com Pardella<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup>. Em relação aos resultados da massa seca de parte aérea (MSPA), não houve diferença significativa entre os tratamentos. Os tratamentos EcoTrich<sup>®</sup>, Quality<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup> proporcionaram maior massa seca de raiz (MSRA), sendo significativamente superior ao tratamento controle e semelhante ao fungicida (Tabela 4).

**Tabela 4. Comprimento da parte aérea (CPA), comprimento de raiz (CRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSRA) de plântulas de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens* no teste de emergência.**

| Tratamentos           | CPA            | CRA           | MSPA   | MSRA   |
|-----------------------|----------------|---------------|--------|--------|
|                       | ----- cm ----- | ----- g ----- |        |        |
| Testemunha            | 5,5b           | 8,5b          | 0,040a | 0,022b |
| EcoTrich <sup>®</sup> | 6,5a           | 8,8b          | 0,041a | 0,029a |
| Quality <sup>®</sup>  | 6,0b           | 8,6b          | 0,041a | 0,027a |
| Pardella <sup>®</sup> | 6,8a           | 9,4a          | 0,042a | 0,021b |
| Shocker <sup>®</sup>  | 6,7a           | 9,5a          | 0,042a | 0,027a |
| Fungicida             | 5,9b           | 10,3a         | 0,043a | 0,030a |
| CV (%)                | 10,66          | 6,67          | 5,69   | 11,32  |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T.*

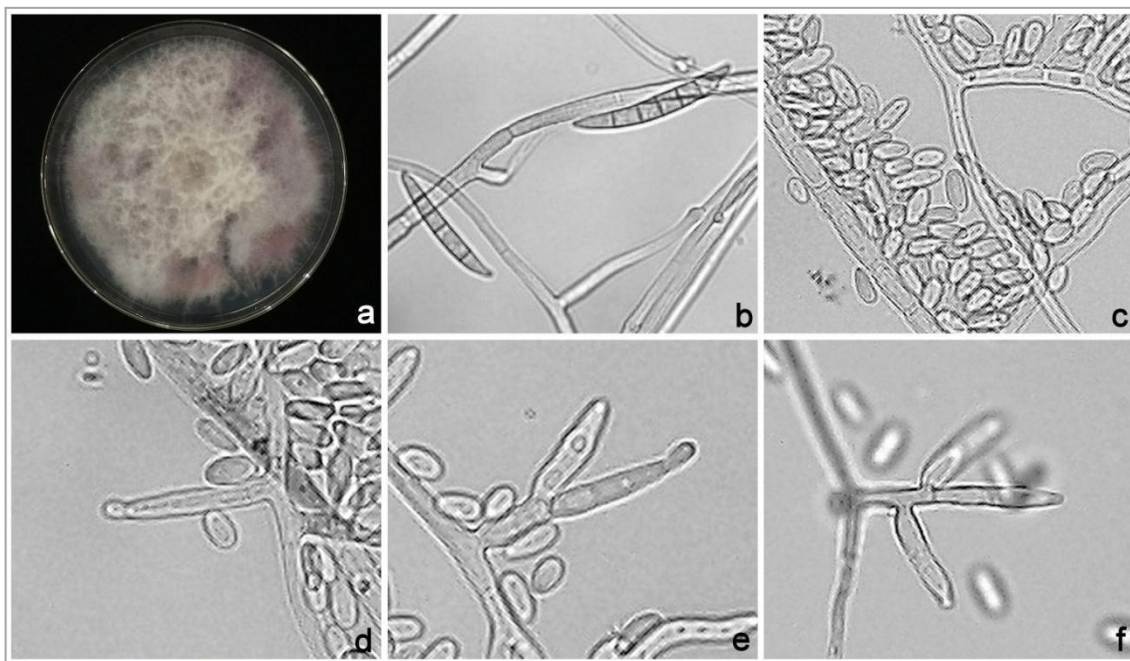
*asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); Shocker® (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes).

Os gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* têm sido detectados colonizando, endofiticamente plantas de diversas famílias botânicas, contribuindo para um controle de inúmeros patógenos, podendo ao longo dos anos alterar o equilíbrio dos agroecossistemas, tornando inóspito ao desenvolvimento desses agentes patogênicos sem causar impactos negativos (MACHADO et al., 2012) e promover a uniformidade de germinação e desenvolvimento das plantas tratadas (FARIAS, 2020). Essas informações podem ser confirmadas através da presente pesquisa, onde tratamento com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* apresentaram elevado potencial de associação com sementes, colonizando 100%, com esporulação abundante, resultando no controle dos fungos associados às sementes e melhorias significativas nas variáveis fisiológicas das plantas tratadas.

### **3.3. Identificação de *Fusarium proliferatum* associado à murcha em feijão-caupi**

#### **3.3.1. Caracterização morfológica**

A colônia do isolado apresenta inicialmente crescimento micelial branco, que gradualmente tornou-se violetas com envelhecimento (Fig 2A) Os macroconídios eram esparsos, com formato reto ou levemente falcados, apresentando de três a cinco septos e medindo de 38,34 a 24,87 µm de comprimento e 4,25 a 2,14 µm de largura (Fig. 2B). Os microconídios eram abundantes, elíptico ou ovais e apresentavam de 9,24 a 4,50 µm de comprimento e 3,35 a 1,43 µm de largura (Fig. 2C). Os microconídios formados em monofialídes (Fig. 2D e 2E) e/ou polifialídes (Fig. 2F) em cadeia curtas e/ou falsas cabeças. Os clamidósporos estavam ausentes. Essas características morfológicas são consistentes com *Fusarium proliferatum* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).



**Figura 2.** Colônia em batata dextrose ágar (BDA) do isolado de *Fusarium* sp. FC-01 observadas em microscopia óptica.. Características morfológicas do isolado FC-01: B Macroconídios. C Microconídio. D Monofiálide. E Monofiálide duplo. F Monofiálide.

### 3.3.2. Identificação molecular de *F. proliferatum*

O isolado associado a sementes de feijão-caupi foi identificado como *F. proliferatum*. Essa espécie pertence ao complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* (FFSC), formando um clado com alto valor de suporte (Figura 3). Membros do FFSC estão comumente envolvidos em doenças destrutivas de inúmeras espécies vegetais economicamente importantes e são capazes de infectar sementes e/ou outros tecidos vegetais no campo causando perdas significativas (WIGMANN et al., 2019).

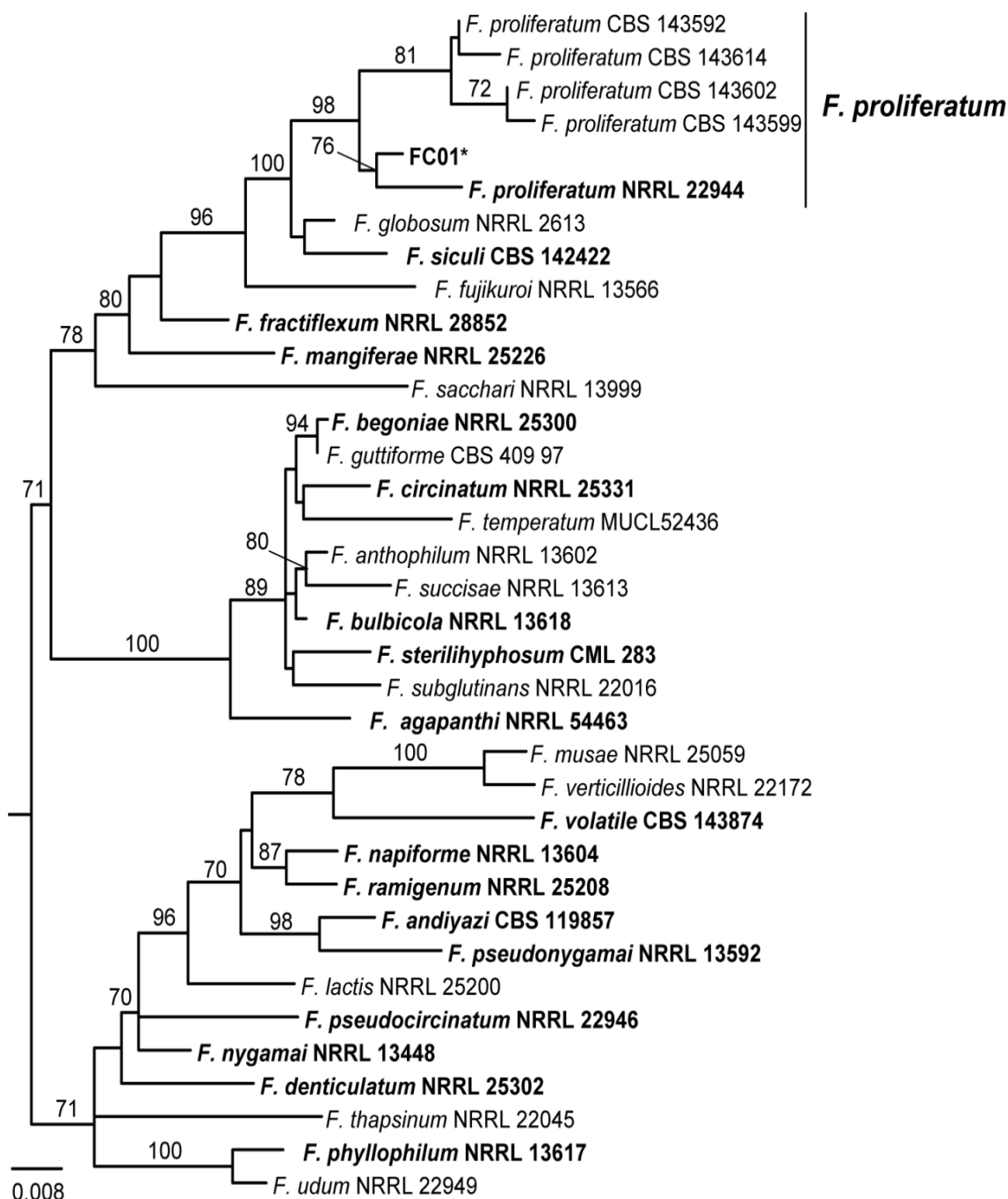


Figura 3. Árvore filogenética do gene *TEF1-α* do isolado do complexo de espécies *Fusarium proliferatum*. As cepas do ex tipo são enfatizadas em negrito. Apenas os valores de suporte do Bootstrap (MV ≥ 70) são exibidos nos nós. "\*" Indica isolado de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). A árvore foi enraizada num ponto médio apenas para facilitar a visualização. A barra de escala representa o número estimado de substituições de nucleotídeos por sítio.

Espécies de *Fusarium* formam um grupo cosmopolita que pode sobreviver, ser facilmente disseminado e introduzido em áreas isentas por meio de sementes infectadas, determinando, assim, o ciclo inicial da doença e infestando, de forma definitiva, os campos de

cultivo (SILVA FLÁVIO et al., 2014). Além disso, a complexidade e variabilidade genética do gênero *Fusarium*, tornam a doença de difícil controle. Nessa perspectiva, a identificação de *Fusarium* a nível de espécies fornecem conhecimentos detalhados sobre a gama de hospedeiros, distribuição geográfica, adaptabilidades climáticas, ciclo de vida e produção de metabólitos por fitopatógenos, entre outros aspectos, sendo fundamental para desenvolver estratégias eficazes de manejo de doenças (DAS et al., 2014; HOUBRAKEN et al., 2014; XU et al., 2009).

### 3.4. Transmissão semente-planta de *F. proliferatum* em feijão-caupi

O fungo *F. proliferatum* (FC-01) se mostrou patogênico e transmitido via sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, apresentando sintomas de deterioração de sementes, podridão do colo, lesões em folhas cotiledonares, resultando na murcha e morte das plantas infectadas. Em contraste, as plantas do grupo controle permaneceram saudáveis. Foi observada uma porcentagem de 63% de plantas sintomáticas (Figura 4).



**Figura 4. Sintomas em plântula de feijão-caupi inoculadas com *Fusarium proliferatum* (FC-01): (A) deterioração de sementes de feijão-caupi inoculadas com o isolado FC-01; (B) podridão do colo e crescimento micelial do isolado FC-01 em plântulas sintomáticas de feijão-caupi; (C) lesões em folhas cotiledonares e crescimento micelial do isolado FC-01.**

A deterioração das sementes reduziu a porcentagem de germinação, emergência e estande de plantas, comprometendo o estabelecimento da cultura. As lesões provocadas no colo das plantas foram deprimidas e localizadas, acompanhada do processo de decomposição, comprometendo a translocação de água e nutrientes e levando a planta ao tombamento. Na parte aérea, também foram observadas murchas, amarelecimento e seca das folhas.

### 3.5. Controle *in vitro* de *F. proliferatum* com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*

#### 3.5.1. Pareamento de culturas

Detectou-se ação antagônica dos isolados de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* sobre *Fusarium proliferatum*, sendo observado que, no teste de confronto direto, todos foram agrupados na classe 1, ou seja, os antagonistas cresceram sobre o patógeno e ocuparam toda a superfície do meio. A partir disso, evidencia-se que todos os antagonistas demonstraram eficiência sobre o crescimento do patógeno. (Tabela 5).

**Tabela 5. Classificação quanto ao antagonismo contra *Fusarium proliferatum* no teste de cultivo pareado com produtos biológicos comerciais.**

| Tratamento            | Classificação |
|-----------------------|---------------|
| EcoTrich <sup>®</sup> | 1             |
| Quality <sup>®</sup>  | 1             |
| Pardella <sup>®</sup> | 1             |
| Shocker <sup>®</sup>  | 1             |

EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg); Shocker<sup>®</sup> (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg).

#### 3.5.2. Metabólitos voláteis

Pelo teste de antibiose, observou-se ação dos metabólitos voláteis produzidos *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* sobre *F. proliferatum*, sendo todos eficientes na redução do crescimento micelial, IVCm de *F. proliferatum*, proporcionando uma elevada porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno, destacando os melhores resultados para o Quality<sup>®</sup> e Pardella<sup>®</sup> (Tabela 6).

**Tabela 6. Ação de metabólitos voláteis de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* e *Bacillus amyloliquefaciens* sobre o crescimento micelial, índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) e porcentagem de inibição (PIC) de *F. proliferatum in vitro*.**

| Tratamento | Crescimento de <i>F. proliferatum</i> | IVCM | PIC |
|------------|---------------------------------------|------|-----|
|            | (cm)                                  | (cm) | (%) |

|                       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|
| Testemunha            | 8,50a | 0,89a | -     |
| EcoTrich <sup>®</sup> | 3,60b | 0,48b | 57,6b |
| Quality <sup>®</sup>  | 2,50b | 0,35c | 70,6a |
| Pardella <sup>®</sup> | 2,57b | 0,37c | 69,7a |
| Shocker <sup>®</sup>  | 1,50b | 0,25d | 82,3a |
| CV (%)                | 11,72 | 12,89 | 11,48 |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg); Shocker<sup>®</sup> (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg).

### 3.6. Controle de *F. proliferatum* inoculado em sementes de feijão-caupi com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*

Nas sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, o tratamento das sementes com produtos biológicos proporcionou redução significativa da incidência de *F. proliferatum*, com redução em torno de 93,6% a 96,8%, quando comparada com o controle, e os mesmos diferiram do fungicida, cuja redução foi 76,1% (Tabela 7).

**Tabela 7. Incidência de *Fusarium proliferatum* em sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos biológicos.**

| Tratamentos           | Incidência (%) |
|-----------------------|----------------|
| Testemunha            | 63a            |
| EcoTrich <sup>®</sup> | 3c             |
| Quality <sup>®</sup>  | 4c             |
| Pardella <sup>®</sup> | 4c             |
| Shocker <sup>®</sup>  | 2c             |
| Fungicida             | 15b            |
| CV (%)                | 26,93          |

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); Shocker<sup>®</sup> (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes).

De acordo com Saravanakumar et al. (2016) a sobrevivência e colonização bem-sucedidas do antagonista na planta hospedeira é essencial para o biocontrole da doença

ocasionada por *Fusarium* spp.. Diversos estudos têm comprovado a eficiência desses agentes de controle biológico no controle de *Fusarium* spp. associados às sementes de inúmeras culturas (FARIAS et al., 2019; CRUZ et al., 2020; CRUZ et al., 2022).

### 3.7. Controle biológico de *Fusarium proliferatum* em plântulas de feijão-caupi tratadas com produtos à base de *T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* via sementes

O tratamento das sementes com produtos biológicos resultou em uma diminuição geral da colonização do patógeno em plantas de feijão-caupi. As plantas inoculadas com *F. proliferatum* e que não foram tratadas apresentaram incidência de doença significativamente superior às que receberam esses antagonistas. Com relação à severidade, observou-se amplitude de variação entre 3,25 e 0,5 (escala de 0-3), onde todos os tratamentos biológicos diferiram do controle (3,25) (Tabela 8).

**Tabela 8. Comprimento de parte aérea (CPA) e plântulas sintomáticas de feijão-caupi, cv. Marataoã, tratadas com produtos biológicos.**

| Tratamento            | Incidência de doença<br>(%) | Severidade<br>(nota) |
|-----------------------|-----------------------------|----------------------|
| Testemunha            | 56,50a                      | 3,25a                |
| EcoTrich <sup>®</sup> | 3,25b                       | 0,5c                 |
| Quality <sup>®</sup>  | 2,50b                       | 0,5c                 |
| Pardella <sup>®</sup> | 2,00b                       | 0,5c                 |
| Shocker <sup>®</sup>  | 1,50b                       | 0,25c                |
| Fungicida             | 8,25b                       | 1,0b                 |
| CV (%)                | 5,31                        | 20,04                |

\*Valores calculados com base numa amostra de 12 plantas para as quais atribuíram-se notas de 0 a 5 em que: 0= ausência de sintoma; 1= sintomas iniciais de murcha (amarelecimento) e descoloração vascular; 2= até 25% das folhas com murcha e descoloração vascular; 3= até 50% das folhas com murcha e descoloração vascular; 4 = até 75% das folhas com murcha e descoloração vascular; 5= plantas mortas. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Testemunha (sem tratamento); EcoTrich<sup>®</sup> (*T. harzianum* - 60g/100kg, contato); Quality<sup>®</sup> (*T. asperellum* - 200g/100kg imersão); Pardella<sup>®</sup> (*T. harzianum*, *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens* - 60g/100kg, imersão); Shocker<sup>®</sup> (*T. harzianum* e *B. amyloliquefaciens* - 300g/100kg, imersão); Fungicida (Captana – 240g do produto para 100 kg de sementes).

A maioria dos antagonistas atuam por diferentes mecanismos de ação ao mesmo tempo. Normalmente, isolados de *Bacillus* e *Trichoderma* atuam por parasitismo, onde os microrganismos podem penetrar nos patógenos, alimentando-se deles e danificando suas paredes celulares. Também apresentam como mecanismo de ação a produção de metabólitos tóxicos, que inibem componentes celulares do patógenos e indução de defesa, que estimulam suas próprias respostas imunológicas contra doenças (LAHLALI et al., 2022). A combinação desses mecanismos torna esses antagonistas eficazes no controle de doenças em diversas culturas agrícolas.

Além disso, o uso de diferentes microrganismos na formulação representa melhorias importantes, pois podem complementar as deficiências de outros, permitindo o desenvolvimento de um produto com melhores qualidades, com ganhos significativos no rendimento das culturas (POVEDA; EUGUI, 2022).

Os benefícios da associação entre *Trichoderma* e *Bacillus* foram observados no presente trabalho, onde o produto que apresentou melhores resultados foi Shocker<sup>®</sup>, que é formulado com *T. harzianum* cepa CPQBA 040-11DRM 09 e *B. amyloliquefaciens* cepas CPQBA 040-11DRM 01 e CPQBA 040-11DRM 04.

#### 4. CONCLUSÃO

Os produtos EcoTrich<sup>®</sup>, Quality<sup>®</sup>, Pardella<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup> reduzem os fungos associados a sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã;

O tratamento das sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã, com os produtos EcoTrich<sup>®</sup>, Quality<sup>®</sup>, Pardella<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup> proporcionam um aumento na germinação, emergência e crescimento de plântulas;

*Fusarium proliferatum* é patogênico e transmitido via sementes de feijão-caupi, cv. Marataoã;

Os produtos EcoTrich<sup>®</sup>, Quality<sup>®</sup>, Pardella<sup>®</sup> e Shocker<sup>®</sup> reduzem a incidência e severidade da murcha ocasionada por *F. proliferatum* em plantas de feijão-caupi, cv. Marataoã.

#### REFERÊNCIAS

Arruda, K. R., Smiderle, O. J., & Vilarinho, A. A. (2009). **Uniformidade de sementes de genótipos de feijão-caupi cultivados em dois ambientes no Estado de Roraima.** *Revista Agro@mbiente on-line*, 3(2), 122-127.

Bastos, C. N. (1997). **Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos.** *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 441-443.

Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). ***In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens.**

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ***Regras para análise de sementes.*** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA, 2009. 395p.

MACIEL, Caciara Gonzatto; WALKER, Clair; MUNIZ, Marlove Fátima Brião; ARAÚJO, Maristela Machado. (2014) **Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* no controle de patógenos em sementes.** *Revista Árvore*, v. 48, 2024.

Chin, J. M., Lim, Y. Y., & Ting, A. S. Y. (2022). Biopriming chilli seeds with *Trichoderma asperellum*: **A study on biopolymer compatibility with seed and biocontrol agent for disease suppression.** *Biological Control*, 165, 104819.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 11, safra 2023/24, n. 8 levantamento, maio 2024.

Cruz, J. M. F. L., Farias, O. R., Moura, I. N. B. M., Linné, J. A., Silva, L. D. R., & Nascimento, L. C. (2022). **Microbiolization of cowpea seeds with commercial strains of *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*.** *Revista Ceres*, 69, 613-618.

Cruz, J. M. F. L., Medeiros, E. C., Farias, O. R., Silva, E. C., & Nascimento, L. C. (2020). **Microbiolization of organic cotton seeds with *Trichoderma* sp. and *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Seed Science*, 42.

Daryaei, A., Jones, E. E., Ghazalibiglar, H., Glare, T. R., & Falloon, R. E. (2016). **Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*.** *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 999-1009.

Das, S., Dash, H.R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). **Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms.** *Journal of Microbiological Methods*, 103, 80-100.

Dennis, C., & Webster, J. (1971). **Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*.** III. Hyphal interaction.

Dinesh, K., Sinha, B., & Bai, A. T. (2018). ***In vitro* studies on efficacy of various *Trichoderma* spp. Against collar rot of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc.** *Manipur. International Journal of Chemical Studies*, 6(6), 1654-1656.

Farias, O. R., Nascimento, L. C., Cruz, J. D. L., Silva, H. A. O., Oliveira, M. D. M., Bruno, R. D. L. A., & Arriel, N. H. C. (2019). **Biocontrol potential of *Trichoderma* and *Bacillus* species on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.**

- Houbraken, J., de Vries, R.P., & Samson, R.A. (2014). **Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species.** *Advances in Applied Microbiology*, 86, 199-249.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A. K., Steinberg, C., ... & Friberg, H. (2016). **Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples.** *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 491-501.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing.
- Machado, D. F. M., Parzianello, F. R., da Silva, A. C. F., & Antonioli, Z. I. (2012). **Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente.** *Revista de Ciências Agrárias*, 35(1), 274-288.
- Maguire, J. D. (1962). **Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor.** *Crop Science*, 2, 176-177.
- Maruyama, C. R., Bilesky-José, N., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2020). **Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 225.
- Medeiros, F. H. V. D., Silva, J. C. P. D., & Pascholati, S. F. (2018). **Controle biológico de doenças de plantas.** *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*, 1.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Burgess, L. W. (1987). **Characterization of *Fusarium beomiforme* sp. nov.** *Mycologia*, 79(6), 884-889.
- Oliveira, J. A. (1991). **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.).**
- Omoigui, L. O., Danmaigona, C. C., Kamara, A. Y., Ekefan, E. J., & Timko, M. P. (2018). **Genetic analysis of *Fusarium* wilt resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.).** *Plant Breeding*, 137(5), 773-781.
- Poveda, J., & Eugui, D. (2022). **Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture.** *Biological Control*, 105100.
- Rego, C. H. Q., França-Silva, F., Gomes-Junior, F. G., Moraes, M. H. D. D., Medeiros, A. D. D., Silva, C. B. D. (2020). **Using Multispectral Imaging for Detecting Seed-Borne Fungi in Cowpea.** *Agriculture*, 10(8), 361.
- Rodrigues, A. A. C., & Menezes, M. (2005). **Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds.** *Mycopathologia*, 159(1), 79-85.
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y., & Chen, J. (2016). **Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on**

**enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum***. *Biological control*, 94, 37-46.

Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., & Kendrick, B. (2011). **The genera of Hyphomycetes: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre**. *Utrecht: The Netherlands*.

Silva Flávio, N. S. D., Sales, N. D. L. P., Aquino, C. F., Soares, E. P. S., Aquino, L. F. S., & Catão, H. C. R. M. (2014). **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais**. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(1), 7-20.

Singh, V., Upadhyay, R. S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). **Seed biopriming with *Trichoderma asperellum* effectively modulate plant growth promotion in pea**. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9(3), 361-365.

Sousa, M. V., Machado, J. C., Pfenning, L. H., Kawasaki, V. H., Araújo, D. V., Silva, A. A., & Martini Neto, A. (2008). **Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro**. *Tropical Plant Pathology*, 33(1), 41-48.

Wigmann, É. F., Behr, J., Vogel, R. F., & Niessen, L. (2019). **MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 5323-5337.

Xu, X. & Nicholson, P. (2009). **Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight**. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1), 83-103.

Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). **Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics**. *Fungal Biology Reviews*, 30(2), 74-90.