



JOSÉ MONTEIRO DA MOTA

**DIVERSIDADE FÚNGICA E TRANSMISSÃO DE
Colletotrichum truncatum E *Macrophomina phaseolina* EM
SEMENTES DE FEIJÃO-FAVA**

**Teresina - PI
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M917d Mota, José Monteiro

Diversidade fúngica e transmissão de *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão-fava.

/ José Monteiro Mota – 2016.

. 63 f.: il.

Dissertação(Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

Orientação: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Junior

1. *Phaseolus lunatus* 2 .Pré-condicionamento osmótico 3. Patologia de sementes 4. Transmissão semente-plântula I. Título

CDD 635.651

JOSÉ MONTEIRO DA MOTA

**DIVERSIDADE FÚNGICA E TRANSMISSÃO DE *Colletotrichum truncatum* E
Macrophomina phaseolina EM SEMENTES DE FEIJÃO-FAVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para a obtenção do Título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

Coorientador

Dr. Maruzanete Pereira de Melo

Teresina - PI
2016

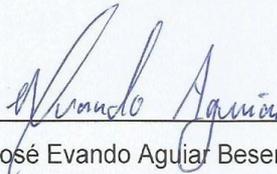
DIVERSIDADE FÚNGICA E TRANSMISSÃO DE *Colletotrichum truncatum* E
Macrophomina phaseolina EM SEMENTES DE FEIJÃO-FAVA

JOSÉ MONTEIRO DA MOTA

Biólogo

Aprovada em 29/10/2016

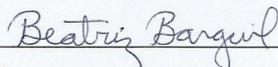
Comissão Julgadora:



Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – Presidente
CCA/UFPI

MARUZANETE PEREIRA DE MELO

Dr. Maruzanete Pereira de Melo – Titular
CCA/UFPI



Profa. Dra. Beatriz Meireles Barguil – Titular
UESPI



Profa. Dra. Dejânia Vieira de Araújo – Titular
UNEMAT

À minha mãe, Maria da paz, pai Aristeu Mota (in memoriam),
irmã Jaqueline Monteiro, bem como minha prima
Rávila Mota e sobrinhos, por me incentivarem
a lutar pelos meus objetivos.

Com todo amor,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por ter me proporcionado saúde e força para encarar esta jornada;

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do curso;

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior), pela concessão de bolsa de estudo;

Ao Prof. Dr. José Evando A. Beserra Jr, pela orientação, paciência e apoio durante todo o curso;

Ao Dr. Maruzanete Pereira de Melo, pela colaboração no projeto;

À Prof^a Dr^a Beatriz Meireles Barguil, pela colaboração na execução da pesquisa;

À RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) pela cessão de espaço laboratorial e de casa de vegetação para condução dos experimentos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, pelo conhecimento transmitido;

Aos colegas do curso Enayra Sousa, Samara Raquel, Nilza Carvalho, Arthur Gonçalves, Vicente Neto, João Pedro, Maristela Pessoa, Janaína Mendes, Carlos Frazão, Rosianne Moura, Mynor Gárcia e Sâmia Natacia pelos momentos compartilhados de troca de experiências, de descontração e companheirismo;

Aos alunos e bolsistas dos cursos de Engenharia Agrônômica e Ciências Biológicas da UFPI e UESPI, Emanoela Sousa, Maria Carneiro, Alexandre Silva, Francisca Flávia, Alessandra Lima e Rayssa Cavalcante, pela amizade e pela ajuda disponibilizada na condução dos experimentos;

Aos meus amigos Antonio Flávio, Enayra Sousa, Denilson Avelino, Júlia Cariolano, Chayana Aquino, Allan Aquino, Irisneide Máximo, Alexandre Brito, Fabiana Soares, Tannata Alixandre, Daíse Cardoso, Alba Patrícia, Cícero Cordeiro, Airton Sousa, Janaira Nunes, Leonarda Beserra, Nayane Carvalho, Miracir Rodrigues, entre tantos outros que fiz durante a vida e que estiveram presentes dando forças pra que eu pudesse continuar, quando tudo parecia tão difícil e pela compreensão da ausência que se fez necessária em muitos momentos;

À minha família pelo carinho, apoio e pela assistência no que podiam;

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

ASSIM MESMO

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro
Seja gentil, assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo
Seja honesto assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra
Construa assim mesmo.

Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja
Seja Feliz assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja que, no final das contas, é entre você e DEUS,

Nunca foi entre você e as outras pessoas.

Madre Teresa de Calcutá,

versão da obra original de

Dr. Kent M. Keith.

RESUMO

No Brasil, a espécie *Phaseolus lunatus* L., conhecida como feijão-fava, é cultivada predominantemente por pequenos produtores. Informações a respeito do manejo da cultura são escassas, bem como dos patógenos e das doenças que a afetam. A ocorrência de doenças e a falta de qualidade das sementes são as principais causas da baixa produtividade, visto que muitos patógenos como os fungos, podem ser transmitidos da semente para a planta. A análise fitossanitária de sementes pode fornecer informações essenciais para adoção de medidas de controle sobre lotes de sementes, na certificação etc. Entre os fungos fitopatogênicos do feijão-fava destacam-se *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina*, causadores da antracnose e podridão de carvão respectivamente. Diante da escassez de informações acerca da sanidade e transmissão de fungos por sementes de feijão-fava, objetivou-se avaliar a incidência fúngica em sementes de 34 acessos de feijão-fava e verificar a possibilidade de transmissão de *C. truncatum* e *M. phaseolina* pelas sementes através do método da restrição hídrica na inoculação de sementes. Para os estudos da análise sanitária, lotes de 400 sementes de cada acesso foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1 % por 3 minutos, seguido de duas lavagens com água destilada esterilizada e depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar. Após incubação foram identificados pelos caracteres morfológicos 22 gêneros de fungos, entre eles os fitopatógenos *Colletotrichum truncatum* (incidência de 0,9 5%), *Fusarium* spp. (1,27 %), *Macrophomina phaseolina* (1,58 %), *Rhizoctonia solani* (0,01 %) e *Sclerotium* sp. (0,28 %). Os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* sp. e *Monilinia* sp. corresponderam juntos a 63,76 % das colônias observadas. O sequenciamento e análise filogenética dos genes GAPDH e TEF identificaram *C. truncatum* e *M. phaseolina*, respectivamente. Para os estudos de transmissão, adicionou-se manitol ao meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) obtendo-se meios com diferentes potenciais hídricos os quais foram incubados por diferentes períodos de tempo, consistindo nos seguintes tratamentos: T1: 0,0 MPa SI (sem inóculo) por 48 h; T2: 0,0 MPa CI (com inóculo) por 48h; T3: - 0,2 MPa por 48h; T4: -0,4 MPa por 48h; T5: -0,6 MPa por 72h; T6: - 0,8 MPa por 96h e T7: -1,0 MPa por 120h. As sementes foram incubadas a 25° C, com fotoperíodo de 12 horas, permanecendo nestas condições por períodos variáveis. Os parâmetros avaliados foram teste de germinação em rolo de papel, emergência de plântulas em areia e teste de sanidade de sementes. O T4 proporcionou melhores condições para impedir temporariamente a germinação das sementes, promovendo maior incidência de sementes infectadas por *C. truncatum* e maior porcentagem de plântulas doentes. A metodologia foi eficaz na inoculação de *M. phaseolina* nas sementes, entretanto, o patógeno prejudicou a germinação das sementes, independente do tratamento inoculado. Ambos os fungos são transmitidos da semente para plântula de feijão-fava, causando doença em diferentes órgãos aéreos.

Palavras-chaves: Pré-condicionamento osmótico, patologia de sementes, *Phaseolus lunatus*, transmissão semente-plântula.

ABSTRACT

In Brazil, *Phaseolus lunatus* L. species, known as lima bean is grown mainly by small farmers. Information about crop management are scarce, as well as pathogens and the diseases that affect it. The occurrence of diseases and the lack of quality of the seeds are the main causes of low productivity, since many pathogens such as fungi can be transmitted to the plant seed. The plant seed testing can provide essential information for adopting control measures on seed lots, certification and so on. Among the pathogenic fungi of lima bean stand out *Colletotrichum truncatum* and *Macrophomina phaseolina*, causing anthracnose and charcoal rot respectively. Considering the lack of information about health and transmission of fungal lima bean seeds, we had the objective of evaluate the fungal incidence in 34 lima bean seeds access and verify the possibility of *C. truncatum* and *M. phaseolina* by transmission seeds through the water restriction in seed inoculation. For studies of health analysis, batches of 400 seeds each access was sterilized by immersion in sodium hypochlorite (NaOCl) solution of 1 % for 3 minutes, followed by two washes with sterile distilled water and placed in Petri dishes containing medium Potato Dextrose Agar (PDA) . After incubation, we could identify the morphological characters 22 genera of fungi, including the pathogens *Colletotrichum truncatum* (incidence 0,95 %), *Fusarium* spp. (1,27 %), *Macrophomina phaseolina* (1,58 %), *Rhizoctonia solani* (0,01 %) and *Sclerotium* sp. (0,28 %). The *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* sp. and *Monilinia* sp. corresponded together 63,76 % of the observed colonies. The sequencing and phylogenetic analysis of GAPDH and TEF genes identified *C. truncatum* and *M. phaseolina*, respectively. For transmission studies, mannitol was added to the medium PDA obtaining media with different water potentials which were incubated in different lengths of time consisting of the following treatments: T1: 0.0 MPa SI (without inoculum) for 48 hours; T2: 0.0 MPa CI (with inoculum) for 48 hours; T3: - 0.2 MPa for 48 hours; T4: -0.4 MPa for 48 hours; T5: - 0.6 MPa for 72 hours; T6: - 0.8 MPa for 96 hours and T7: -1.0 MPa for 120 hours. The seeds were incubated at 25 °C, with a photoperiod of 12 hours, remained for varying periods. The evaluated parameters were germination test on roll paper, seedling emergence in sand and seed health testing. T4 provided better conditions to temporarily prevent the germination of seeds, promoting higher incidence of seeds infected by *C. truncatum* and higher percentage of sick seedlings. The methodology was effective in inoculating *M. phaseolina* in the seeds, however, the pathogen damaged the germination of seeds, regardless of treatment inoculated. Both fungi are transmitted from seed to lima bean seedling, causing disease in different aerial organs.

Keywords: Osmotic preconditioning, seed pathology, *Phaseolus lunatus*, seed-seedling transmission.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Germinação em rolo de papel de sementes de feijão-fava inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i> em diferentes potenciais hídricos.....	50
Figura 2 -	Emergência em areia de plântulas de feijão-fava a partir de sementes inoculadas com <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i> em diferentes potenciais hídricos.....	51
Figura 3 -	Plântulas de feijão-fava com sintomas provocados pela ação de <i>Colletotrichum truncatum</i> (A) e <i>Macrophomina phaseolina</i> (B) em diferentes potenciais hídricos.....	53
Figura 4 -	Porcentagens de <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i> em sementes de feijão-fava, detectados pelo teste de sanidade em meio batata-dextrose-agar em diferentes potenciais hídricos.....	56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	População fúngica associada a sementes de 34 acessos de feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.). Teresina, 2016.....	35
Tabela 2 -	Incidência dos principais fungos fitopatogênicos associados a sementes de 34 acessos de feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.). Teresina, 2016.....	38

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Porcentagem de <i>Colletotrichum truncatum</i> (A) e <i>Macrophomina phaseolina</i> (B) recuperados a partir de órgãos sintomáticos de plântulas de feijão-fava emergidas após inoculação das sementes submetidas a diferentes potenciais hídricos.....	55
------------	---	----

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	13
2.0	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	A cultura do feijão-fava.....	15
2.2.	Antracnose do feijão-fava.....	17
2.3.	Podridão de carvão em leguminosas.....	18
2.4.	Transmissão de fungos pela semente.....	20
2.5.	Método de restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes.....	22
	REFERÊNCIAS.....	24
3.0	Capítulo 1 – Diversidade fúngica em sementes de feijão-fava.....	30
3.1	RESUMO.....	30
3.2	ABSTRACT.....	31
3.3	INTRODUÇÃO.....	32
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.5	Teste de sanidade.....	33
3.6	Purificação e preservação.....	34
3.7	Análise filogenética.....	34
3.8	Resultados e discussão.....	35
3.9	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41
4.0	Capítulo 2 - Transmissão semente-plântula de <i>Colletotrichum truncatum</i> e <i>Macrophomina phaseolina</i> em feijão-fava.....	44
4.1	RESUMO.....	44
4.2	ABSTRACT.....	45
4.3	INTRODUÇÃO.....	46
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.5	Teste de germinação em rolo de papel.....	48
4.6	Teste de germinação em areia.....	49
4.7	Teste de sanidade.....	49
4.8	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.9	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
5.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	APÊNDICE.....	62

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, *Phaseolus lunatus* L., também conhecido como feijão-fava, tem o seu cultivo comumente associado à agricultura familiar, e seus grãos, servem como importante alimento e fonte de renda (SANTOS, 2002). A maior parte da produção encontra-se no Nordeste do país, tendo em 2014, produzido 7.416 toneladas, ou seja, 96,56 % da produção nacional (IBGE, 2014). Além da reduzida área plantada de feijão-fava no Brasil, irregularidades das chuvas, a elevada ocorrência de doenças colabora para a redução da produtividade. Inúmeras doenças causadas por fungos, vírus e nematoides causam danos à cultura do feijão-fava. Entre as doenças fúngicas encontradas nos plantios brasileiros, muitas são transmitidas por sementes (CARVALHO et al., 2015).

As plantas são infectadas por inúmeros patógenos, que podem ser disseminados de diferentes formas, entre elas as sementes constituem-se como um competente veículo de dispersão. Noventa por cento das lavouras agrícolas são propagadas por sementes, as quais podem agir como o inóculo inicial de patógenos no campo, podendo favorecer uma epidemia (GOULART, 2005). A falta de qualidade sanitária das sementes é uma das principais causas da baixa produtividade das lavouras. Vários patógenos são transmitidos a partir de sementes para plântulas, como o caso de *Magnaphorte oryzae*, causador da brusone em triticales (MARTINS, 2004), *Curvularia lunata* em arroz (SILVA, 2014b), *Colletotrichum lindemuthianum* em *Phaseolus vulgaris* (REY, 2009), dentre outros. A taxa de transmissão é determinada por fatores ambientais, características do hospedeiro, assim como pela quantidade e localização do inóculo (REY, 2009; ZAMBOLIM, 2005).

Para entender como os patógenos atuam sobre as sementes e sobre o processo infeccioso decorrente na planta, faz-se necessário a obtenção de um número significativo de sementes previamente infectadas. Devido à dificuldade de obtenção de forma natural de sementes com diferentes níveis de infecção, técnicas de inoculação artificial tem-se tornado necessárias para realização de pesquisas (MACHADO, 1988). Métodos como aplicação de suspensão de esporos diretamente em sementes secas apresentam falhas, pois não garantem um nível ideal de infecção. Frente a dificuldades na obtenção de sementes infectadas, a técnica do

condicionamento osmótico de sementes, vem sendo usada como forma alternativa de inoculação de fungos (CARVALHO, 1999). A técnica do condicionamento osmótico ou restrição hídrica é responsável por modificar as condições do meio; impedindo a ocorrência da protusão de radícula e propiciando às sementes, a realização dos processos bioquímicos essenciais no desencadeamento do processo de retomada de crescimento embrionário. Permite, portanto, o contato de sementes com o substrato úmido por tempos mais prolongados, podendo ser aplicados com eficácia na inoculação de sementes (MACHADO et al., 2012).

Pesquisas sobre a incidência e transmissão de fungos fitopatogênicos em sementes de feijão-fava são escassas. Dentre os fungos importantes causadores de doença no feijão-fava merecem destaque *Colletotrichum truncatum*, agente etiológico da antracnose, e *Macrophomina phaseolina*, responsável pela podridão de carvão, ambos transmitidos por sementes em outras leguminosas (NECHET; HALFELD, 2005; PAULA JUNIOR et al., 1995).

Portanto, este estudo teve os objetivos de avaliar a diversidade de fungos em amostras de sementes de feijão-fava, e verificar a possibilidade de transmissão semente-plântula de *C. truncatum* e *M. phaseolina* por meio da aplicação da técnica de restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de feijão-fava.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do feijão-fava

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) chamado também de feijão-lima, feijão manteiga, feijão-espadinho ou simplesmente fava é uma das cinco espécies do gênero *Phaseolus* exploradas comercialmente (RACHIE et al., 1980; SANTOS, 2002). O feijão-fava pertence à ordem Fabales, família Fabaceae e gênero *Phaseolus* (CRONQUIST, 2012). É cultivada nas Américas, na Europa, no leste e oeste da África e no sudeste da Ásia (OLIVEIRA, 2011).

Em relação ao seu centro de origem e dispersão, algumas teorias são sugeridas. De acordo com a teoria de Mackie (1943) a origem dessa espécie deu-se na América Central, especificamente na Guatemala, onde teria dispersado em três direções; na primeira teria chegado à América do Sul através da Colômbia, Peru e Equador. A segunda direção teria sido pela Ramificação Hopi, dirigindo para o norte, chegando aos Estados Unidos e na terceira direção, as sementes ramificaram-se para o Caribe, chegando às Antilhas direcionando-se para o norte da América do Sul. Baudoin (1988) afirma que o feijão-fava foi domesticado no norte da América, México, Guatemala e no Peru.

Recentemente o México foi identificado como uma área importante de diversidade genética, para as populações selvagens de *P. lunatus* e também posterior domesticação. Estudos envolvendo amostras de feijão-fava de várias regiões do México e região andina, com uso de georeferenciamento, revelaram a existência dos dois “pools” gênicos distintos mesoamericanas (MI e MII), mas também encontraram evidências para a possível existência de dois subgrupos dentro de MI, (MIA e MIB). Evidências indicam um evento de domesticação para MI no centro-oeste do México e para domesticação de MII seria uma região entre Guatemala e Costa Rica. A grande diferenciação genética encontrada entre conjuntos de genes (MII, MIA, e MIB) sugere que estes devem ser consideradas como unidades de conservação separadas de estudos regionais (CASTILLO et al., 2014).

No Brasil, o feijão-fava é cultivado principalmente nos estados da Paraíba, Ceará, Pernambuco, Piauí e Minas Gerais. Constitui-se em uma das alternativas de renda e alimento para muitas famílias de baixa renda, principalmente da população

nordestina, cuja região é a maior produtora do país (IBGE, 2014). Seu cultivo é rústico, sendo plantado consorciado com milho, mandioca ou mamona, utilizando estas culturas como suporte (AZEVEDO et al., 2003). Quanto ao desenvolvimento podem apresentar hábitos de crescimento determinado ou indeterminado (SANTOS, 2002). No Brasil as variedades de feijão-fava cultivadas são do tipo trepador, e que possuem um ciclo biológico de cerca de seis meses, podendo ser feita mais de uma colheita neste período (VIEIRA, 1992b).

Os grãos de feijão-fava representam uma excelente fonte de proteínas, fibras, vitaminas e minerais. Algumas variedades como as de tegumento bege-claro podem apresentar um teor de proteína com porcentagem de 26,7g, sendo, portanto, um alimento altamente nutritivo (AZEVEDO et al., 2003; LONG, 2014). Apesar dessa característica ainda é pouco consumida no Brasil, quando comparado com outros feijões (ALVES, 2006). O déficit no consumo pode estar associado à tradição do brasileiro em consumir mais o feijão-comum do tipo carioca; o tempo de cocção mais longo também é uma característica que deve ser levada em consideração (LYMMAN, 1983).

Santos (2002) atribuiu a baixa produtividade, ao fato da maior parte do feijão-fava nacional ser cultivado por pequenos agricultores, com baixa ou nenhuma aplicação de tecnologia, que possibilite um aumento na produtividade e minimize as perdas. Realidade inversa pode ser encontrada no estado da Califórnia (EUA), onde há intenso uso de tecnologia na produção de feijão-fava, como pode ser constatado pelo desenvolvimento de novas variedades, por meio da hibridação convencional e seleção de características específicas almejadas disponíveis no germoplasma em estudo (LONG, 2014).

A área ocupada com o plantio de feijão-fava no Brasil em 2014 foi de 23.697 ha apresentando uma queda se comparado com 2013, onde foram plantados 25.542 ha. Com área menor de plantio, houve diminuição na produção, caindo de 7.957 t para 7.680 t. O maior rendimento em 2014 foi registrado no Ceará com 3.116 t. O estado do Piauí, em 2013, teve produção de 266 t aumentando para 616 t de grãos de feijão-fava em 2014 (IBGE, 2013; IBGE, 2014).

O feijão-fava apresenta maior capacidade de adaptação que o feijão-comum a climas quentes e úmidos e ao estresse hídrico (VIEIRA, 1992b). Além disso, *P. lunatus* quando comparado com outros feijões [espécies de *Vigna* (*V. unguiculata*, *V. umbellata*, *V. angularis*, *V. radiata*) e *P. vulgaris*]; submetidos às mesmas condições

de cultivo e tratos culturais, apresentou melhores resultados de produção (VIEIRA, 1992a). Entretanto, mesmo o feijão-fava apresentando maior capacidade de adaptação a situações adversas, pode ter seu desenvolvimento comprometido: plantas de feijão-fava submetidas ao estresse hídrico em várias fases de desenvolvimento apresentaram diminuição da área foliar, da quantidade de clorofila, além do abortamento de vagens e flores (OLIVEIRA et al., 2014).

Essa cultura pode ser acometida por inúmeras doenças, sendo mais um dos fatores que reduzem a quantidade e qualidade dos grãos (SILVA et al., 2014a). Tais doenças podem ser causadas por vírus (RAMOS-SOBRINHO, 2014), nematoides (BITENCOURT; SILVA, 2010), bactérias (OSDAGHI, 2015) e fungos (PAULA JUNIOR et al., 1995).

2.2 Antracnose em feijão-fava

É fato que a ocorrência de doenças na cultura do feijão-fava pode reduzir a qualidade das sementes e prejudicar a produtividade da cultura; neste contexto, a antracnose, mostra-se como uma doença relevante para a cultura no Brasil, por apresentar características que favorecem o crescimento do patógeno, podendo causar graves prejuízos se não for controlada (PAULA JUNIOR et al., 1995).

O fungo causador da antracnose é *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, foi descrito pela primeira vez causando antracnose em feijão-fava e em diversas outras leguminosas nos Estados Unidos em 1935 (DAMM et al., 2009). No Brasil, foi encontrado causando lesões em folhas e vagens de feijão-fava (CARVALHO, 2009).

A espécie apresenta alto poder de destruição, causando doença em inúmeras espécies tropicais e subtropicais, como leguminosas e solanáceas (CANNON, 2012). É um patógeno hemibiotrófico, apresentando, portanto, duas fases: biotrófica e necrotrófica. Objetivando estabelecer uma relação de parasitismo compatível, o fungo produz sobre a cutícula dos órgãos do hospedeiro, apressórios melanizados; para penetração no tecido vegetal, após estabelecimento do parasitismo, passa a produzir hifas primárias, deixando as células do hospedeiro vivas – esta é a fase biotrófica da infecção. No segundo momento, as hifas secundárias que já se formaram, acabam por matar as células da planta hospedeira, portanto sendo esta a fase necrotrófica do ciclo de vida do fungo (MÜNCH et al., 2008).

A antracnose em feijão-fava se manifesta em vagens por meio de lesões de cor marrom-escura, tendo bordas vermelho-arroxeadas, em que se formam acérvulos do patógeno; apresentando-se como uma massa branca, onde podem ser vistas setas escuras. Lesões em forma de manchas avermelhadas podem ser encontradas também na parte inferior de folhas, na parte superior das hastes, no hipocótilo e em pecíolos jovens; dependendo do caso, observam-se queda de flores e vagens prematuras além de folhas cloróticas (PAULA JUNIOR et al., 1995).

No Brasil, *C. truncatum* também é naturalmente encontrado causando doença em espécies botânicas agronomicamente importantes, como a soja e o feijão-caupi. Em soja, a antracnose responde por inúmeros prejuízos às lavouras, principalmente aquelas instaladas no cerrado. A sintomatologia dessa doença é bem semelhante com a encontrada em sementes e plantas de feijão-fava; são vistas lesões nos cotilédones, haste, ramos e ainda a ocorrência de deterioração de sementes, morte de plântula e infecção sistêmica em plantas adultas (HENNING, 2005). A umidade se torna um elemento importante para o progresso da doença; pois pode causar apodrecimento e queda de vagens, germinação de grãos ainda em formação e abertura de vagens imaturas (ECCO, 2012). No feijão-caupi os sintomas de antracnose ocorrem em ramos e folhas, principalmente no início dos estádios de reprodução das plantas (SPONHOLZ et al., 2006).

Embora os prejuízos causados por *C. truncatum* sejam evidentes no feijão-fava, faltam estudos mais aprofundados sobre estimativas de perdas, controle, melhoramento genético e epidemiologia.

2.3 Podridão de carvão em leguminosas

Macrophomina phaseolina (Tass.) Goid é o agente etiológico da podridão de carvão ou podridão cinzenta do caule; mesmo recebendo estes nomes, acomete outras partes dos vegetais como folhas, raízes e hastes (NECHET, 2005) Pertencente ao Filo Ascomycota, apresenta conídios produzidos em picnídios e possui grande capacidade de sobreviver em condições adversas (crescendo bem em temperaturas a partir de 30 °C) ou na ausência de hospedeiro suscetível, sobrevivendo através de estruturas de resistência, denominada de microescleródios, os quais são produzidos facilmente e é possível observar estas estruturas no interior e na superfície da planta (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; KIMATI et al., 2005).

Mesmo sem a presença de restos culturais, a sobrevivência de *M. phaseolina* no solo pode se prolongar por até 15 anos, relacionando-se com as condições ambientais (SHORT et al., 1980). A estrutura de resistência, constantemente, torna-se fonte inicial de inóculo para o próximo plantio (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990).

Esse patógeno foi relatado pela primeira vez no Brasil infectando raízes de feijão-comum (BITANCOURT, 1935). Em feijão-comum, a doença ocorre no caule e nas raízes (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990). Em soja a podridão de carvão causa perdas de até 50% da produção durante anos secos, em cultivares tardias no norte do estado do Paraná (FERREIRA et al., 1979). *M. phaseolina* causa doença em mais de 500 hospedeiros, entre estes feijão-fava, embora não existam estudos que comprovem sua ação na cultura (KIMATI et al., 2005). Devido sua natureza polífaga, o controle usando rotação de culturas mostra-se eficiente somente com utilização de gramíneas, com exceção do milho e sorgo (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

O déficit hídrico e elevada temperatura do solo são fatores que favorecem a severidade da podridão de carvão provocada por *M. phaseolina*, por favorecer a germinação dos microescleródios (ALMEIDA, 2001). Estudos realizados por Kending et al. (2000) associam a baixa umidade do solo e as altas temperaturas com o desenvolvimento da doença, provocada por isolados de *M. phaseolina* presentes em sementes de soja e feijão comum. A baixa umidade e altas temperaturas são fatores que favorecem a infecção e severidade de sintomas em sorgo (FREDERIKSEN, 1986).

A infecção por *M. phaseolina* ocorre em várias fases de vida das plantas, implicando em diferentes sintomas, de acordo com o momento em que o fungo infecta o hospedeiro. Em plântulas de feijão-caupi, os sintomas são observados nos cotilédones, causando tombamento pré ou pós-emergência. Quando o fungo se manifesta em plantas adultas, ocorre amarelecimento, murcha, lesões necróticas no caule, desfolha e posterior morte prematura (ABAWI; PASTOR-CORRALES, 1990; DHINGRA; SINCLAIR, 1978). Não obstante ao feijão-caupi, os sintomas em soja, também variam de acordo com o momento em que ocorre a infecção, obedecendo ao binômio idade da planta/período de infecção. Quando o patógeno se manifesta durante o processo de emergência, são vistas no colo rasas lesões marrom-escuras. Em plantas estabelecidas o principal sintoma é o amarelecimento persistente,

manifestado a partir da época da formação de vagens, além de murcha e raízes com epiderme solta, observando-se com frequência a presença de microescleródios (ALMEIDA et al., 2001).

2.4 Transmissão de fungos pela semente

A alta qualidade de sementes pode influenciar diretamente no sucesso da lavoura e contribuir de maneira significativa para obtenção de bons resultados de produtividade. A ação e a interação de fatores fisiológicos, físicos e patológicos contribuem para a deterioração das sementes, processo que de maneira natural envolve a interação de mudanças citológicas, fisiológicas, bioquímicas e físicas das sementes, resultando na perda do vigor e viabilidade (CARVALHO E NAKAGAWA, 2000).

Sementes infectadas são importantes fontes de inóculo primário, podendo os patógenos ser ou não transmitidos para plântulas o que irá depender da quantidade, localização do patógeno nas sementes, características do hospedeiro e patógeno, assim como das condições ambientais (GALLI et al., 2007).

Por meio das sementes, microrganismos podem ser introduzidos em nova área, onde podem sobreviver ao longo dos anos e se disseminar na população de plantas, ocasionando surtos de doenças (OLIVEIRA et al., 2013). Esses mesmos autores, estudando o controle de *C. truncatum* em soja, encontraram a presença de diversos fungos patogênicos, em lotes de sementes certificadas, afetando o processo de germinação de sementes. Fungos como *Sclerotinia sclerotiorum* associados às sementes, reduzem a porcentagem e velocidade de emergência das sementes de crambe (*Crambe abyssinica*), girassol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) e níger (*Guizottia abyssinica*), além de provocar tombamento de pré e pós-emergência (VENTUROSOSO et al., 2015).

A infecção de sementes por patógenos pode ocorrer por via sistêmica, através da planta mãe, por infecção local por meio do tegumento ou pericarpo e via grão de pólen infectado. Na primeira o patógeno cresce de maneira sistêmica, através do sistema vascular, pela flor, pedicelo, funículo ou pedúnculo, por onde então entram na semente. Entre esses patógenos são encontrados fungos causadores de murcha vascular, que também podem infectar sementes via

pericarpo. Infecção via estigma também é considerada sistêmica, já que o patógeno o coloniza, e faz isso seguindo o caminho do tubo polínico, podendo germinar nos estigmas; infectar ovários não fertilizados, substituindo sementes por escleródios, servindo de inóculo para o próximo plantio. Infecções locais são provocadas por patógenos presentes no ambiente externo, que atinjam flores, sementes indiferenciadas e frutos e sementes maduras. Outro mecanismo de infecção de sementes é através do contato das sementes com o patógeno, que adere na superfície da semente, podendo ser transmitido para as plântulas, mesmo estas não estando infectadas internamente (DHINGRA, 2005; ZAMBOLIM, 2005).

Em feijão comum e soja, espécies de *Colletotrichum* causam infecção nas sementes via pericarpo, correlacionando-se com a severidade de colonização da vagem, podendo estas, não apresentarem sintomas. Nesse caso, o fungo limita-se às áreas das camadas superiores do tegumento; quando o número de colônias mostra-se maior, micélios colonizam sementes e os cotilédones. A infecção de *M. phaseolina* em sementes de feijão, depende do contato das vagens com o solo, para que assim o patógeno chegue à semente (DHINGRA, 2005; PINTO, 2005).

A transmissibilidade é mensurada, por meio da visualização de sintomas nas plântulas, admitindo-se que a única forma de transmissão teve origem nas sementes (MENTEM; BUENO, 1987). Sementes infectadas podem causar danos de até 90% na cultura do feijão-comum (VECHIATO et al., 1997). Raças de *Colletotrichum lindemuthianum* podem ter taxas de transmissão para plântulas de até 80%, confirmando que a falta de qualidade das sementes de feijão comum representa umas das principais causas da baixa produtividade de feijão no Brasil, tendo em vista que, muitas vezes os agricultores fazem uso de suas próprias sementes não certificadas (REY, 2009). Para a cultura do feijão-fava acredita-se que a transmissão se dê do mesmo modo que ocorre em sementes de soja. Pesquisas de transmissão de *C. truncatum* e *M. phaseolina* a partir de sementes de *P. lunatus* não existem.

A transmissão de *C. truncatum* e *Phomopsis sojae* através das sementes de soja, provenientes de plantas artificialmente inoculadas, foi avaliada em condições de campo. Ambos os patógenos afetaram negativamente a qualidade sanitária e fisiológica das sementes; houve menor taxa de germinação com o aumento da incidência de *P. sojae* e *C. truncatum*; indicando o efeito negativo destes patógenos sobre as sementes (GALLI et al., 2007).

Diferentes metodologias são empregadas para obtenção de sementes infectadas com microrganismos. Para Sousa et al. (2008) o método da restrição hídrica tem se mostrado muito eficiente, já que possibilita a exposição da semente ao fungo, sem interferir no armazenamento, possibilitando seu uso posterior por um período maior que as demais metodologias. O uso dessa técnica permitiu a inoculação do fungo *Fusarium verticillioides* em sementes de milho resultando na ocorrência de 90% de transmissão para hastes e raízes das plântulas (BARROS et al., 2014). Em feijão comum o uso de solutos restritores, proporcionou uma incidência média de sementes contaminadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* de 64% (COSTA et al., 2003).

Entre os fungos fitopatogênicos, a maioria pode ser transmitido da semente para a plântula. *C. truncatum* e *M. phaseolina*, constitui-se em uma fonte de disseminação em campos de produção (BRASIL, 2009; SPONHOLZ et al., 2006). Elucidar como ocorre a contaminação de sementes, os mecanismos de transmissão e seus efeitos nas lavouras mostram-se estratégias importantes para o produtor adotar medidas de controle que atendam suas necessidades.

2.5 Método de restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes

Nas áreas de tecnologia e patologia de sementes, o uso da restrição hídrica tem sido de fundamental importância para avanços em estudos que envolvem controle de germinação, sanidade e detecção de patógenos em sementes (MACHADO et al., 2012). Proposta primeiramente por Heydecker et al. (1973), a técnica de condicionamento osmótico ou restrição hídrica, tem por objetivo uniformizar os processos que envolvem a germinação de sementes do mesmo lote.

Na restrição hídrica, faz-se o uso de soluções osmóticas, ajustando os potenciais hídricos de modo que permitam a ocorrência dos processos fisiológicos iniciais (fases I e II - embebição), sem que a umidade esteja a um nível que proporcione o alongamento celular e posterior protusão radicular (fase III). Com a aplicação dessa técnica as sementes ao passar por processos de secagem, podem ser manuseadas ou armazenadas (DEL GIUDICE et al., 1999).

Para o ajuste do potencial hídrico de substratos podem ser utilizados sais como $MgSO_4$, $NaCl$, $MgCl_2$, K_3PO_4 , KH_2PO_4 , glicerol, manitol e polietileno glicol (BRADFORD, 1986; SANTOS, 2008). Machado et al. (2001a) obteve sucesso na

inoculação de diversos fungos em sementes de milho, fazendo uso desta técnica. Araújo et al. (2006), inoculando *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão, obtiveram porcentagens satisfatórias de sementes infectadas, utilizando a restrição hídrica.

Muitos trabalhos necessitam de sementes infectadas, servindo de estudos para esclarecimento de diversos processos biológicos, como a disseminação e transmissão de patógenos, tratamento e comportamento de sementes armazenadas etc. Para tanto, a técnica da restrição hídrica passou a ser utilizada na inoculação de fungos em sementes, sendo proposto seu uso pelo grupo de patologia de sementes da Universidade Federal de Lavras-MG, na qual fungos são cultivados em meio de cultura com potencial osmótico controlado, onde posteriormente depositam-se as sementes sobre as colônias fúngicas por tempos determinados (MACHADO et al., 2012).

O método da restrição hídrica é eficaz na inoculação de diferentes fungos em sementes de milho, pois evita protusão da radícula, sem contudo afetar o processo de germinação. Essa técnica propicia condições ótimas de infestação, onde se obtêm plântulas com lesões, provenientes dos fungos objetos de estudo (MACHADO et al., 2001a). Em sementes de soja submetidas à restrição hídrica, observou-se que o tempo de exposição da semente à colônia fúngica pode ser maior à medida que o potencial hídrico aumenta, ocasionando maior infecção sem a ocorrência de prejuízos nas fases de germinação da semente (MACHADO et al., 2001b). Trabalhos utilizando métodos de restrição hídrica envolvendo os patossistemas *C. truncatum*, *M. phaseolina* e feijão-fava, não existem, sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de sanar tais necessidades.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Root rots of bean in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies**. Centro de Agricultura Tropical, Bogotá, 114 p., 1990.
- ALVES, A. U. **Rendimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) em função da adubação organomineral**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, Areia. 67 f. 2006.
- ALMEIDA, A. M. R.; TORRES, E.; FARIAS, J. R. B.; BENATO, L. C.; PINTO, M. C.; SILVANA, R. R. M. ***Macrophomina phaseolina* em soja: sistema de semeadura, sobrevivência em restos de cultura e diversidade genética**. Embrapa Soja, Londrina, v. 34, 47 p., 2001.
- ARAÚJO, D. V.; POZZA, E. A.; MACHADO, J. C.; ZAMBENEDETTI, E. B.; CARVALHO, E. M.; CELANO, F. A. O. Relação entre níveis de inóculo de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* nas sementes e o progresso da ramulose do algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 147-151, 2006.
- AZEVEDO, J. N.; FRANCO, L. J. D.; ARAÚJO, R. O. C. Composição química de sete variedades de feijão-fava. EMBRAPA MEIO-NORTE. **Comunicado Técnico**, Teresina, p. 33-38, 152 p., 2003.
- BARROS, L. S.; GUIMARÃES, S. C.; KOBAYASTI; MENDONÇA, E. A. F. Restrição hídrica na inoculação artificial de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 10, n. 06, p. 1-6, 2014.
- BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). **Genetic resources of *Phaseolus* bean**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, p. 393-407, 1988.
- BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, São Paulo, v.1, n. 2, 41 p., 1935.
- BITENCOURT, N.; SILVA, G. S. Reação de genótipos de fava a *Meloidogyne incognita* e *M. enterolobii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 184-186, 2010.
- BRADFORD, K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hortscience**, Alexandria, v. 21, n. 5, p.1105-1112, 1986.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 200 p., 2009.
- CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S. *Colletotrichum*— current status and future directions. **Studies in Mycology**. Philadelphia - USA, v. 73, p.181–213, 2012.

- CASTILLO, J. M.; PÉREZ, L. C.; VIRAMONTES, S. V.; NOH, R. H. A.; SÁNCHEZ, M. I. C. Genetic structure within the mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (fabaceae) from México as revealed by microsatellite markers: implications for conservation and the domestication of the species. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 101, n. 5, p. 851–864, 2014.
- CARVALHO, E. M. S. Antracnose em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): Caracterização do agente causal e reação de genótipos a *Colletotrichum truncatum*. **Tese** (Doutorado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista. 53 f., 2009.
- CARVALHO, J. C. B. **Uso da Restrição hídrica na inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 98 p., 1999.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, ed. 4, v. 1, 588 p. 2000.
- COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.
- CRONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA S., LARGE, B., LIU, L., SUCHARD, M. A., HUELSENBECK, J. P.; MrBayes 3.2.: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, Basingstoke – GB, v. 61, p. 539-542, 2012.
- DAMM, U.; WOUDEBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 45-87, 2009.
- DEL GIUDICE, M.P.; REIS, M. S.; SEDIYAMA, C. S.; SEDIYANA, T.; MOSQUIM, P. R. Efeito do condicionamento osmótico na germinação de dois cultivares de soja. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 46, n. 55, p. 435-444, 1999.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 166 p., 1978.
- DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógenos fungicos por sementes. In.: Zambolim, L. **Sementes: Qualidade fitossanitária**. Viçosa, p. 75-104, 2005.
- ECCO, M. E. S. Avaliação de antracnose (*Colletotrichum truncatum*) nas cultivares de soja convencional em diferentes épocas de plantio, no norte de mato grosso na safra 2010/2011. **Resumos...** Congresso Brasileiro de Soja. VI Congresso Brasileiro de Soja, Cuiabá, jun. 2012.
- FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 41 p., 1979.

FREDERIKSEN, R. A. **Compedium of sorghum diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 106 p., 1986.

GALLI, J. A.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Phomopsis sojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 33, n.1, p. 40-46, 2007.

GOULART, A. C. P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, ed. 1, 72 p., 2005.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Embrapa soja, Londrina, n. 264, 2. ed., 52 p., 2005.

HEYCKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**. London, v. 246, p. 42-44, 1973.

IBGE, **Produção Agrícola Municipal Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, v. 40, 102 p., 2013.

IBGE, **Produção Agrícola Municipal. Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, v. 41, 100 p., 2014.

KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 895–900, 2000.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia volume II**, ed. 4, São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 1, 663 p., 2005.

LYMMAN, J. M. Adaptation studies on lima bean accessions in Colombia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, n.3, p. 369-373. 1983.

LONG, R. **Lima Bean Production in California** - ANR Catalog, 24 p., 2014.

MACHADO, J. C. **Patologia de Sementes: fundamentos e aplicações**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE, 107 p., 1988.

MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N.; GUIMARÃES, R. M.; MACHADO, C. F. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. In: **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 20, p. 37-63, 2012.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 88-94, 2001a.

MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, p. 95-101, 2001b.

MACKIE, W. W. Origin dispersal and variability of the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). **Hilgardia**, Berkeley, v.15, n.1, p.1-29, 1943.

MARTINS, T. D.; LAVORENTI, N. A.; URASHIMA, A. S. Comparação entre métodos de avaliação de transmissão de *Pyricularia grisea* através de sementes em triticales, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 425-428, 2004.

MENTEN, J.O.M.; BUENO, J. T. Transmissão de patógenos pelas sementes. In: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes. Comitê de Patologia de Sementes. **Patologia de Sementes**. Fundação Cargill, Campinas, p. 164-191, 1987.

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

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Ocorrência do Fungo *Macrophomina phaseolina* em Feijão-caupi no Estado de Roraima. Embrapa - **Comunicado Técnico**, 8 p., 2005.

OLIVEIRA, V. A.; MARTINS, L. P.; GONÇALVES, R. C.; BENÍCIO, L. P. F.; COSTA, D. L.; LUDWIG, J. Use of seed treatment with fungicide in control of *Colletotrichum truncatum* and physiological quality of soybean seeds *Glycine max*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n.2, p. 98-106, 2013.

OLIVEIRA, F. N.; TORRES, S. B.; BENEDITO, C.P. Caracterização botânica e agrônômica de acessos de feijão-fava, em Mossoró, RN, **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, n. 1, p. 143-148, 2011.

OLIVEIRA, A. E. S.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F. E. P., GOMES, R. L. F. Desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **Revista HOLOS**, v. 1, n. 30, p. 143-151, 2014.

OSDAGHI, E.; ALI AKBAR, Z. *Phaseolus lunatus*, a New Host of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in Iran. **Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p.56-60, 2015.

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

PINTO, N. F. J. A. Análise sanitária da produção de sementes de grandes culturas. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005.

RACHIE, K. O.; SONG, L.; LYMAN, J. Lima bean (*Phaseolus lunatus*) and potential in the tropics. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (Eds.). **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanic Garden, p. 375-381, 1980.

RAMOS-SOBRINHO, R.; XAVIER, C. A. D.; PEREIRA, H. M. B.; LIMA, G. S. A.; ASSUNÇÃO, I. P.; MIZUBUTI, E. S. G.; DUFFY, S.; ZERBINI, F. M. Contrasting genetic structure between two begomoviruses infecting the same leguminous hosts. **Journal of General Virology**, v.95, p. 2540-2552, 2014.

REY, M. S. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2009.

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

SANTOS, M. C. A.; AROUCHA, E. M. M.; SOUZA, M. S.; SILVA, R. F.; SOUZA, A. P. Condicionamento osmótico de sementes – revisão de literatura. **Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 2, p. 1-6, 2008.

SHORT, G. E., WYLLIE, T. D., BRISTOW, P. R. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and residue of soybean. **Phytopathology**, v. 70, p.13–17, 1980.

SILVA, J. A.; OLIVEIRA M. G.; SOUZA L. T.; ASSUNÇÃO I. P.; LIMA G. A.; MICHEREFF, S. J. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 98-101, 2014a.

SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, L. J. G.; SILVA, E. K. C.; PEREIRA, T. S. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014b.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; LUDWIG, H. P.; HAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; NETO, A. M. Métodos de inoculação e efeitos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 41-48, 2008.

SPONHOLZ, C.; FILHO, F. R. F.; MAIA, C. B.; RIBEIRO, V. Q.; CARDOSO, M. O. Reação de genótipos de feijão-caupi ao *Colletotrichum*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 19 p., 2006.

VECHIATO, M. H.; CASTRO, J. L.; ISHIMURA, I.; SABINO, J. C.; MENTEN, J. O. M. Antracnose do feijoeiro: correlação entre severidade em vagens e a incidência do patógeno nas sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p.159-163, 1997.

VENTUROSOS, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; VENTUROSOS, L. A. C.; PONTIM, B. C. A.; REIS, G. F. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 788-793, 2015.

VIEIRA, R. F. A.; VIEIRA, C.; ANDRADE, G. A. Comparações agronômicas de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n.6, p.841-850, 1992a.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, p.30-37, 1992b.

ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, ed. Suprema gráfica e editora, v. 22, 502 p. 2005.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE FÚNGICA EM SEMENTES DE FEIJÃO-FAVA

RESUMO

Apesar do alto potencial de produção do feijão-fava, observa-se escassez de informação a respeito dos patógenos associados e causadores de doenças em sementes de feijão-fava. O teste de sanidade é uma ferramenta eficaz para levantamento dos fungos que ocorrem naturalmente em sementes, necessário para certificação de lotes de sementes e para estudos de transmissão semente-plântula. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fúngica de sementes de feijão-fava. Foram avaliados 34 acessos de feijão-fava, que foram depositadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de feijão-fava da UFPI. Lotes de 400 sementes de cada acesso foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1 % por 3 minutos, seguido de duas lavagens em água destilada e esterilizada, e sacas a temperatura ambiente. As sementes foram depositadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar, onde permaneceram em estufa incubadora por até sete dias, para posterior identificação das espécies fúngicas presentes. Após incubação foram identificados pelos caracteres morfológicos 22 gêneros de fungos, entre eles os fitopatógenos *Colletotrichum truncatum* (incidência de 0,95 %), *Fusarium* spp. (1,27 %), *Macrophomina phaseolina* (1,58 %), *Rhizoctonia solani* (0,01 %) e *Sclerotium* sp. (0,28 %). Os fungos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* sp. e *Monilinia* sp. corresponderam juntos a 63,76 % das colônias observadas. O sequenciamento e análise filogenética dos genes GAPDH e TEF confirmaram a identidade de *C. truncatum* e *M. phaseolina*, respectivamente.

Palavras-chaves: *Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Phaseolus lunatus*, sanidade de sementes.

CHAPTER I

FUNGAL DIVERSITY IN LIMA BEAN SEEDS

Despite the high production potential of lima beans, we can observe the lack of information about the associated pathogens and disease causing in lima bean seeds. The health test is an effective tool for survey of fungi that occur naturally in seeds, it is necessary for the certification of lots of seeds and the seed-seedling transmission studies. The purpose of this study was to evaluate the diversity about the fungal lima bean seeds. We evaluated 34 lima bean accesses, which were deposited in the Active Germplasm Bank (BAG) of fava bean at UFPI. Batches of 400 seeds each access were sterilized by immersion in sodium hypochlorite (NaOCl) 1 % for 3 minutes followed by two washes in sterile distilled water, and sacks at ambient temperature. The seeds were placed in Petri plates containing potato dextrose agar, which remained in an oven incubator for up to seven days for subsequent identification of the fungal species found. After incubation were identified by morphological characters 22 genera of fungi, including phytopathogenic the *Colletotrichum truncatum* (incidence 0,95%), *Fusarium* spp. (1,27 %), *Macrophomina phaseolina* (1,58 %), *Rhizoctonia solani* (0,01 %) and *Sclerotium* sp. (0,28 %). The *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* sp. and *Monilinia* sp. They corresponded together 63,76 % of the observed colonies. The sequencing and phylogenetic analysis of the TEF and GAPDH gene confirmed the identity of *C. truncatum* and *M. phaseolina*, respectively.

Key-words: *Colletotrichum truncatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Phaseolus lunatus*, seed health.

INTRODUÇÃO

A qualidade fitossanitária de sementes é determinada pela incidência de microrganismos que causam danos à semente durante o armazenamento, ou que são transmitidos pela semente, sendo capazes de causar doenças e reduções na produtividade das culturas (COSTA et al., 2013). O teste de sanidade de sementes é usado para definir a qualidade de um lote, visando identificar a presença de patógenos; que possam afetar a viabilidade das sementes, ser transmitidos para plântula ou aparecer durante o armazenamento (BRASIL, 2009).

No Brasil, são comuns os levantamentos de fungos em sementes de feijão comum, feijão-caupi (RODRIGUES; MENEZES, 2002; ZUCARELI et al., 2015) e em soja (COSTA et al., 2013), mas escassos em feijão-fava. O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é uma leguminosa trepadeira de cultivo anual, que produz vagens com grãos comestíveis (AZEVEDO, 2003). É plantada em regime de sequeiro e em consórcio com outras culturas, principalmente por pequenos produtores, que fazem pouco uso de tecnologias, ocasionando baixos índices de rendimento e grande oscilação nos resultados da colheita (OLIVEIRA et al., 2014). No entanto, o feijão-fava possui grande diversidade genética e elevado potencial agrícola, além de se adaptar às mais diferentes condições ambientais (VIEIRA, 1992). No Brasil, os estados da região nordeste se destacam como maiores produtores, produziram em 2014 cerca de 96% de toda produção nacional dessa leguminosa (IBGE, 2014).

Apesar de ser a segunda espécie do gênero *Phaseolus* mais consumida no país, é escasso o conhecimento da micoflora em sementes desta leguminosa. No Brasil, o único estudo desta natureza foi realizado com apenas quatro amostras obtidas no estado da Paraíba (ARAÚJO et al., 1983). É sabido que a ocorrência de microrganismos associados às sementes pode causar a redução do vigor e da emergência de plântulas ocasionando baixos rendimentos (ROY et al., 2001). Além disso, sementes contaminadas podem introduzir ou disseminar fitopatógenos em novas áreas de cultivo, que em condições ambientais favoráveis, podem resultar em epidemias (OLIVEIRA et al., 2013).

Devido à necessidade de conhecer os fungos presentes em sementes de feijão-fava para o estabelecimento de estratégias de manejo, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade fúngica em sementes de feijão-fava.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste de sanidade

Foram avaliados trinta e quatro acessos de feijão-fava adquiridos com produtores rurais e em feiras livres, nos anos de 2014 e 2015, nos estados do Ceará, Maranhão, Paraíba e Piauí, as quais foram posteriormente depositadas no Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava da UFPI, com os seguintes códigos: UFPI-880, UFPI-881, UFPI-883, UFPI-884, UFPI-885, UFPI-886, UFPI-888, UFPI-889, UFPI-890, UFPI-891, UFPI-892, UFPI-893, UFPI-894, UFPI-895, UFPI-896, UFPI-897, UFPI-898, UFPI-899, UFPI-900, UFPI-902, UFPI-903, UFPI-904, UFPI-905, UFPI-906, UFPI-907, UFPI-908, UFPI-910, UFPI-911, UFPI-912, UFPI-913, UFPI-914, UFPI-915, UFPI-916 e UFPI-923 (APÊNDICE).

Os acessos foram submetidos ao teste de sanidade de sementes. Lotes de 400 sementes de cada amostra foram desinfestadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1 %, por três minutos, seguido de duas lavagens com água destilada e esterilizada. As sementes foram depositadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, contendo meio batata-dextrose-agar (BDA), em um total de seis sementes por placa, onde permaneceram entre cinco e sete dias em estufa incubadora, com temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

As colônias fúngicas que se desenvolveram sobre as sementes e em seu redor, foram transferidas para meio BDA para posterior identificação, que foi realizada em microcultura, conforme Sutton (1980), com posterior montagem das lamínulas em lâminas, coradas com azul de Amann ou com glicerina 50 %, para observação das estruturas fúngicas ao microscópio óptico. As colônias foram quantificadas quanto sua incidência média dentro dos 34 acessos e o percentual de frequência fúngica foi avaliado por gênero ou espécie dentro do total geral de colônias encontradas.

Por apresentarem dificuldades para esporulação, alguns isolados fúngicos foram repicados para diferentes meios de cultura como extrato de Malte, Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA) e Aveia, e submetidos a diferentes estímulos luminosos, como escuro contínuo e fotoperíodo de 12 h a 26 ± 2 °C, bem como adição de palitos devidamente esterilizados, junto às colônias de fungos como *Sclerotium* sp. com a finalidade de estimular a produção de esporos para montagem de lâminas e posterior identificação morfológica ao microscópio.

Análise filogenética

Amostras dos isolados dos gêneros *Colletotrichum* e *Macrophomina* foram identificados pela amplificação e sequenciamento dos genes GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) e TEF (Elongation factor 1- α), respectivamente. Os processos de extração do DNA, PCR e sequenciamento foram realizados no Laboratório de Sistemática de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras. O DNA foi extraído utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, WI, USA). As reações foram realizadas utilizando o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, Madison, WI, USA).

Para a amplificação do gene GAPDH foram utilizados os primers GDF1 (5'-GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA-3') e GDR1 (5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTACTTGAGCATGT-3') (TEMPLETON et al., 1992). Para a amplificação do gene TEF foram utilizados os primers EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3') (CARBONE; KOHN, 1999) e Ef-2 Reverse (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL et al., 1998). Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Os fragmentos gênicos foram sequenciados, nas direções senso e antisenso, pela empresa Macrogen, USA. As sequências editadas foram comparadas com a base de dados GenBank, por meio do programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Alinhamentos múltiplos das sequências foram gerados utilizando-se o programa CLUSTALW implementado pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e a análise foi realizada com o programa MEGA 6.0 utilizando o método de máxima parcimônia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectadas e identificadas espécies de fungos compreendidas em 22 gêneros (Tabela 1).

Tabela 1. População fúngica associada a sementes de 34 acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), Teresina, 2016

Gênero/Espécie	Colônias	Frequência ¹	Incidência ²	Incidência Máx ³
<i>Aspergillus</i> spp.	773	23,89	5,68	19,25
<i>Bipolaris</i> sp.	1	0,03	0,01	0,25
<i>Chaetomium</i> sp.	1	0,03	0,01	0,25
<i>Cladosporium</i> sp.	23	0,71	0,17	5,75
<i>Colletotrichum truncatum</i>	129	3,99	0,95	10,00
<i>Curvularia</i> sp.	417	12,89	3,07	11,25
<i>Eurotium</i> sp.	18	0,55	0,14	1,50
<i>Fusarium camptoceras</i>	117	3,62	0,86	5,00
<i>Fusarium clamydosporum</i>	13	0,40	0,10	0,75
<i>Fusarium</i> spp.	41	1,27	0,75	4,75
<i>Fusarium verticillioides</i>	4	0,12	0,03	0,75
<i>Fusiccocum</i> sp.	59	1,82	0,43	3,50
<i>Geotrichum</i> sp.	2	0,06	0,01	0,50
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	6	0,19	0,04	1,25
<i>Macrophomina phaseolina</i>	215	6,65	1,58	18,25
<i>Monilinia</i> sp.	342	10,57	2,51	9,75
<i>Nigrospora</i> sp.	14	0,43	0,10	1,00
<i>Penicillium</i> spp.	531	16,41	3,90	17,00
<i>Pestalotia</i> sp.	7	0,22	0,05	0,50
<i>Phytium</i> sp.	49	1,51	0,36	11,75
<i>Phomopsis</i> sp.	7	0,22	0,05	1,50
<i>Rhizoctonia solani</i>	1	0,03	0,01	0,25
<i>Rhizopus</i> sp.	114	3,52	0,84	5,00
<i>Sclerotium</i> sp.	9	0,28	0,07	0,75
<i>Talaromyces</i> sp.	21	0,65	0,15	1,50
Não Identificado	330	10,20	2,43	14,75
Total de colônias	3244			

¹Frequência das espécies fúngicas expressa em porcentagem, considerando-se a soma total das colônias obtidas.

²Incidência média das espécies fúngicas expressa em porcentagem, considerando-se as 34 amostras.

³Incidência máxima obtida considerando as 34 amostras avaliadas.

Os fungos que ocorreram com frequência superior a 10 % foram *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* sp. e *Monilinia* sp., juntos corresponderam a 63,76

% do total de colônias obtidas, alcançando incidências de 5,68; 3,90; 3,07 e 2,51 % respectivamente (Tabela 1). Incidências médias de 18,1, 10,8, 0,16, e 0,46 % para *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* sp. e *Monilinia* sp., respectivamente, foram encontradas em quatro amostras de sementes de feijão-fava obtidas da Paraíba (ARAÚJO et al., 1983). Esses fungos são encontrados associados às sementes e geralmente não causam doenças em condições de campo, mas podem comprometer a qualidade das sementes, reduzindo seu poder germinativo e morte de embriões principalmente quando o armazenamento é inadequado (KOBAYASTI; PIRES, 2011).

O gênero *Penicillium* esteve presente em 31 das 34 amostras analisadas, enquanto *Aspergillus* spp. e *Curvularia* sp. foram encontrados em todas as amostras. Há relato de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. afetando a germinação, provocando necrose dos cotilédones, radícula e folhas iniciais de feijão-caupi, resultando em plântulas anormais (RODRIGUES; MENEZES, 2002). Algumas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, além de deteriorar grãos e sementes, podem infectar espécies botânicas, devido sua capacidade de se desenvolver em diferentes tipos de matéria orgânica; podendo produzir micotoxinas (RIVERBERI et al., 2010). *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., quando em elevada incidência, podem causar inviabilidade da germinação e crescimento de estruturas fúngicas sobre as sementes de soja (COSTA et al., 2013).

O gênero *Fusarium* foi encontrado em 22 acessos, totalizando 64,70 % dos lotes. Foram encontradas diferentes espécies: *F. camptoceras*, *F. clamydosporium*, *F. verticillioides* e *Fusarium* spp. Araújo et al. (1983) encontraram frequência de 3,83 % de *Fusarium* spp. em sementes de feijão-fava. Em feijão-fava, não existem relatos de *Fusarium* spp. capazes de causar danos à semente e de serem transmitidos para a plântula. Em outras culturas, a depender da espécie de *Fusarium*, o fungo pode inibir a germinação da semente e ser eficientemente transmitido. Como *Fusarium oxysporum*, transmitido das sementes para plântulas de feijão comum, com taxa de 13,4 % (PARSA et al., 2016). Em feijão-caupi, espécies de *Fusarium* inibiram a germinação de sementes, além de ser observado crescimento micelial sobre cotilédones e folhas iniciais de plântulas emergidas (RODRIGUES; MENEZES, 2002). Interessantemente, alguns membros do gênero *Fusarium* mostram potencial como endófitos capazes de controlar insetos e nematoides (VU et al., 2006; PAPARU et al., 2008). Em culturas como milho (*Zea mays*), a presença de *F.*

verticillioides e *F. graminearum* causaram problemas na germinação (RAMOS et al., 2014).

Entre os fungos considerados importantes patógenos de leguminosas foram encontrados, com baixa incidência, *Colletotrichum truncatum* (0,95 %), *Macrophomina phaseolina* (1,58 %), *Rhizoctonia solani* (0,01 %) e *Sclerotium* sp. (0,07 %) (Tabela 2), evidenciando a importância da semente como veículo de transporte de fungos fitopatogênicos, podendo comprometer a sanidade da cultura. Estes resultados constituem dado relevante para o conhecimento dos patógenos que acometem o feijão-fava no Brasil, uma vez que são escassos os trabalhos de identificação e caracterização de agentes causais de doenças nesta cultura.

Apesar da baixa incidência, *C. truncatum* foi encontrado em 50 % das amostras; o patógeno é o agente causal da antracnose em feijão-fava, ocasionando morte de plântulas e infecções severas em plantas adultas, acarretando perdas na produção (CARVALHO et al., 2015). É a primeira vez que esse patógeno é encontrado associado a sementes de feijão-fava, uma vez que Araújo et al. (1983) não registraram a ocorrência quando avaliaram a sanidade de quatro amostras de feijão-fava obtidas do estado da Paraíba. Em soja, *C. truncatum* já foi encontrado em associação a sementes com incidência de 23,64 % (SOUZA et al., 2011), enquanto que em sementes de feijão-caupi este patógeno não foi relatado (RODRIGUES; MENEZES, 2002).

M. phaseolina apresentou incidência média de 1,58 % (Tabela 2). O fungo causa a podridão de carvão; ocorre em mais de 500 culturas afetando de leguminosas a gramíneas (SARTORATO, 1994; SU et al., 2001). A presença desse patógeno em culturas como o feijão-caupi e soja podem resultar em surtos, com perdas substanciais na produção (GUPTA et al., 2012). Não existem estudos que indiquem a associação de *M. phaseolina* à sementes de feijão-fava.

O sequenciamento de genes house-keeping de isolados fúngicos identificados pela morfologia como *C. truncatum* e *M. phaseolina*, ratificou a identidade dos isolados. Isolados de *C. truncatum* agruparam com o isolado ex-holotype (CBS 151.35) com 90% de bootstrap, enquanto que os isolados de *M. phaseolina* agruparam com isolados de *M. phaseolina* de outros feijões e soja, com 100 % de bootstrap, em ramo distinto da segunda espécie do gênero *Macrophomina*, *M. pseudophaseolina* (dados não mostrados).

Tabela 2. Incidência em porcentagem dos principais fungos fitopatogênicos associados a sementes de 34 acessos de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Teresina, 2016

Acesso	<i>Colletotrichum truncatum</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotium</i> sp.
UFPI 880	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 881	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 883	4,00	3,50	0,00	0,00
UFPI 884	0,00	18,25	0,00	0,00
UFPI 885	0,00	0,25	0,00	0,00
UFPI 886	2,50	0,00	0,00	0,00
UFPI 888	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 889	2,25	0,00	0,00	0,00
UFPI 890	1,25	0,00	0,00	0,75
UFPI 891	0,50	0,00	0,00	0,00
UFPI 892	0,75	0,00	0,00	0,00
UFPI 893	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 894	2,75	8,50	0,00	0,00
UFPI 895	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 896	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 897	1,50	0,00	0,00	0,00
UFPI 898	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 899	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 900	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 902	0,25	0,00	0,00	0,00
UFPI 903	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 904	0,00	1,00	0,00	0,00
UFPI 905	0,00	1,25	0,00	0,00
UFPI 906	0,00	1,25	0,00	0,00
UFPI 907	0,00	0,00	0,00	0,00
UFPI 908	0,75	0,00	0,00	0,00
UFPI 910	0,25	1,00	0,00	0,00
UFPI 911	0,50	4,50	0,00	0,00
UFPI 912	0,75	0,75	0,00	0,75
UFPI 913	1,75	1,75	0,25	0,25
UFPI 914	0,00	1,00	0,00	0,00
UFPI 915	0,25	0,00	0,00	0,00
UFPI 916	2,25	2,00	0,00	0,00
UFPI 923	10,00	8,75	0,00	0,50
Média (%)	0,95	1,58	0,01	0,07

R. solani e *Sclerotium* sp. foram encontrados em incidências de 0,01 e 0,07 %, respectivamente (Tabela 2). *R. solani* é responsável por causar tombamento e podridão das raízes em feijão-fava, enquanto *Sclerotium* sp. causa a podridão do colo (ASSUNÇÃO et al., 2011; SILVA et al., 2014). Mesmo apresentando baixas incidências, ambos os patógenos apresentam potencial de serem introduzidos em novas áreas de cultivo através das sementes, podendo causar doenças e reduções

na produtividade de diversas culturas. Araújo et al. (1983), encontraram *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium rolfsii* com incidências de 3,50 % e 0,05 % em sementes de feijão-fava. Essa cultura apresenta alta susceptibilidade à ação de *S. rolfsii*, devido a dificuldade na obtenção de genótipos resistentes (SILVA et al., 2014). Apesar da importância desses patógenos para o feijão-fava, são escassos os estudos da aplicação de medidas de manejo (ASSUNÇÃO et al., 2011).

Outros gêneros de fungos foram encontrados associados às sementes de feijão-fava: *Phomopsis* sp., *Phytium* sp., *Bipolaris* sp., *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Eurotium* sp., *Fusicocum* sp., *Geotrichum* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Monilinia* sp., *Nigrospora* sp., *Pestalotia* sp., *Rhizopus* sp. e *Talaromyces* sp. totalizando 20,24 % da frequência fúngica. Aproximadamente 10,20 % das colônias fúngicas não foram identificadas pela ausência de esporulação (Tabela 1).

Neste trabalho *Monilinia* sp., *Phytium* sp. e *Rhizopus* sp. foram encontrados causando acentuada podridão em sementes. *Monilinia* sp., *Nigrospora* sp. e *Cephalosporium* sp. Também foram identificados em sementes de feijão-fava, entretanto, a infecção pareceu não afetar a germinação das sementes. Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (1983). Fungos associados às sementes nem sempre são patogênicos, muitas vezes apenas utilizam a semente como via de transporte ou permanecem como saprófitas até que o ambiente se torne favorável ao seu desenvolvimento, não apresentando relevância para a cultura (OLIVEIRA, 2013).

Com a expansão da cultura do feijão-fava no Nordeste brasileiro torna-se importante a realização de estudos sobre a eficácia do tratamento químico de sementes visando o controle de fungos fitopatogênicos, uma vez que ainda não existem fungicidas registrados para esta espécie. Os resultados obtidos neste trabalho darão subsídios para estudos sobre as estratégias de manejo e controle de doenças fúngicas no feijão-fava.

CONCLUSÕES

Há elevada diversidade de fungos associados às sementes de feijão-fava, dentre eles fitopatógenos que podem desencadear doenças e/ou morte de plantas.

As sementes de feijão-fava podem servir de veículo de disseminação de fungos fitopatogênicos importantes para a cultura, como *C. truncatum* e *M. phaseolina*.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E.; DORNELAS, G. V.; LIMA, A. A.; BRUNO, R. L. A.; FILHO, J. J. O. Avaliação da qualidade das sementes usadas para o plantio no estado da Paraíba. II – feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão massacar (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e fava (*Phaseolus lunatus* L.). **Agropecuária Técnica**, Brasília, v. 4, n. 1/2, p. 34-51, 1983.
- ASSUNÇÃO, I. P.; NASCIMENTO L. D.; FERREIRA, M. F.; OLIVEIRA, F. J.; MICHEREFF, S. J.; LIMA, G. S. A. Reaction of faba bean genotypes to *Rhizoctonia solani* and resistance stability. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 492-497, 2011.
- AZEVEDO, J. N.; FRANCO, L. J. D.; ARAÚJO, R. O. C. **Composição química de sete variedades de feijão lima**. Teresina, PI: Embrapa Meio-Norte, Comunicado técnico, n. 152, 4 p., 2003.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 200 p., 2009.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, New York, v. 91, n. 3, p. 553–556, 1999.
- CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, A. M. E.; LAGO, H. M. S.; RODRIGUES, FABRÍCIO, R. Incidência de *Bipolaris bicolor* em sementes de sorgo granífero no Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 13, n. 2, p. 240-247, 2014.
- COSTA, D. S.; BONASSA, N.; NOVEMBRE, A. D. L. C. Incidence of storage fungi and hydropriming on soybean seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 35-4, 2013.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill. **Journal of Phytopathology**, Maldem, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012.
- IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes**. Rio de Janeiro, v. 40, 102 p., 2013.
- KOBAYASTI, L.; ADORIAM, A. I.; PAIVA NETO, V. B.; ALVES, C. Z.; ZUFFO, M. C. R. Incidência de fungos em sementes de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2011.
- O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Pullman - USA, v. 95, p. 2044–2049, 1998.

- OLIVEIRA, V. A.; MARTINS, L. P.; GONÇALVES, R. C.; BENÍCIO, L. P. F.; COSTA, D. L.; LUDWIG, J. Use of seed treatment with fungicide in control of *Colletotrichum truncatum* and physiological quality of soybean seeds *Glycine max*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 4, n. 2, p. 98-106, 2013.
- OLIVEIRA, A. E. S.; SIMEÃO, M.; MOUSINHO, F. E. P., GOMES, R. L. F. Desenvolvimento do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sob déficit hídrico cultivado em ambiente protegido. **HOLOS**, v. 1, n. 30, p. 143-151, 2014.
- PAPARYU, P.; DUBOIS, T.; GOLD, C. S.; NIERE, B.; ADIPALA, E.; COYNE, D. Screenhouse and field persistence of nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* in *Musa* tissue culture plants. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 561-568, 2008.
- PARSA, S.; GARCIA-LEMONS, A. M.; CASTILLO, K.; ORTIZ, V.; LOPEZ-LAVALLE, L. A. B.; JEROME, F. B. V. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Fungal Biology**, v. 120, p. 783-790, 2016.
- RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 1, p. 24-31, 2014.
- RIVERBERI, M.; RICELLI, A.; ZLALIC, S. FABRI, A. A.; FANELLI, C. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Roma, v. 87, n. 3, p. 899-911, 2010.
- RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 3, p. 203-215, 2006.
- RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 532-537, 2002.
- ROY, K. W.; BAIRD, R. E.; ABNEY, T. S. A Review of Soybean (*Glycine max*) Seed, Pod, and Flower Mycofloras in North America, with Methods and a Key for Identification of Selected Fungi. **Mycopathologia**, Mississippi, v. 150, n. 1, p. 15-27, 2001.
- SARR, M. P.; NDIAYE, M'BAYE; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, Borgo Albize, v. 53, n. 2, p. 250-268, 2014.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, Doc. 50, 300 p., 1994.
- SILVA, J. A.; OLIVEIRA M. G.; SOUZA L. T.; ASSUNÇÃO I. P.; LIMA G. A.; MICHEREFF S. J. Reação de genótipos de feijão-fava a *Sclerotium rolfsii*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 98-101, 2014.

SOUSA, T. P.; NASCIMENTO, I. O.; MAIA, C. B.; MORAIS, J.; BEZERRA, G. A.; BEZERRA, J. W. T. Incidência de fungos associados a sementes de soja transgênica variedade BRA valiosa RR. **Agroecossistemas**, v. 3, n. 1, p. 52-56, 2011.

SU, G.; SUH, S. O.; SCHNEIDER, R. W.; RUSSIN, J. S. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 2, p.120-126, 2001.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, London, 696 p., 1980.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TEMPLETON, M. D.; RIKKERINK, E. H.; SOLON, S. L.; CROWHURST, R. N. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase – encoding gene and DNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, v. 122, p. 225-230, 1992.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 174, p. 30-37, 1992.

VU, T.; HAUSCHILD, R.; SIKORA, R. A. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. **Nematology**, v. 8, p. 847-852, 2006.

ZUCARELI L, C.; BRZEZINSKI, C. R.; ABATI, J.; WERNER, F.; JÚNIOR, E. U. R.; NAKAGAWA, J. Qualidade fisiológica de sementes de feijão carioca armazenadas em diferentes ambientes. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 8, p. 803–809, 2015.

CAPÍTULO II

**TRANSMISSÃO SEMENTE-PLÂNTULA DE *Colletotrichum truncatum*
E *Macrophomina phaseolina* EM FEIJÃO-FAVA****RESUMO**

Os fungos *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* estão entre os principais patógenos associados a sementes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) no Brasil, sendo responsáveis por doenças importantes da cultura como a antracnose e a podridão de carvão, respectivamente. As sementes contaminadas podem promover a transmissão de doenças que podem afetar o estande final das plantas, reduzindo consideravelmente os rendimentos. Este trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de transmissão semente-plântula de *C. truncatum* e *M. phaseolina* isolados de sementes de feijão-fava. Adicionou-se manitol ao meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) obtendo-se meios com diferentes potenciais hídricos os quais foram incubados por diferentes períodos de tempo, consistindo nos seguintes tratamentos: T1: 0,0 MPa sem inóculo por 48 h; T2: 0,0 MPa com inóculo por 48h; T3: - 0,2 MPa por 48h; T4: -0,4 MPa por 48h; T5: -0,6 MPa por 72h; T6: - 0,8 MPa por 96h e T7: -1,0 MPa por 120h. As sementes foram incubadas a 25° C, com fotoperíodo de 12 horas, permanecendo nestas condições por períodos variáveis. Os parâmetros avaliados foram teste de germinação em rolo de papel, emergência de plântulas em areia e teste de sanidade de sementes. O T4 proporcionou melhores condições para impedir temporariamente a germinação das sementes, promovendo maior incidência de sementes infectadas por *C. truncatum* e maior porcentagem de plântulas doentes. A metodologia foi eficaz na inoculação de *M. phaseolina* nas sementes, entretanto, o patógeno prejudicou a germinação das sementes, independente do tratamento inoculado. Ambos os fungos são transmitidos da semente para plântula de feijão-fava, causando doença em diferentes órgãos aéreos.

Palavras-chaves: patologia de sementes, *Phaseolus lunatus*, sanidade de sementes, transmissão por sementes, pré-condicionamento de sementes

CHAPTER II

THE SEED-SEEDLING TRANSMISSION OF *Colletotrichum truncatum* AND *Macrophomina phaseolina* IN FAVA BEAN

ABSTRACT

Colletotrichum truncatum and *Macrophomina phaseolina* fungi are among the main pathogens associated with lima bean seeds (*Phaseolus lunatus* L.) in Brazil, and they are responsible for important crop diseases such as anthracnose and charcoal rot, respectively. Contaminated seeds may promote the transmission of diseases that can affect the final process of the plants, reducing yields considerably. The purpose of this study is to verify the possibility of transmission seed-seedling of *C. truncatum* and *M. phaseolina* isolated of lima bean seeds. Mannitol was added to the medium Potato Dextrose Agar (PDA) obtaining media with different water potentials which were incubated for different lengths of time consisting of the following treatments: T1: 0.0 MPa without inoculum for 48 hours; T2: 0.0 MPa with inoculum for 48 hours; T3: - 0.2 MPa for 48 hours; T4: -0.4 MPa for 48 hours; T5: -0.6 MPa for 72 hours; T6: - 0.8 MPa for 96 hours and T7: -1.0 MPa for 120 hours. The seeds were incubated at 25 ° C, with a photoperiod of 12 hours, remained in this condition by variable periods. The evaluated parameters were germination test on roll paper, seedling emergence in sand and seed health testing. T4 provided better conditions to temporarily prevent the germination of seeds, promoting higher incidence of seeds infected by *C. truncatum* and higher percentage of sick seedlings. The methodology was effective in inoculating *M. phaseolina* in the seeds, however, the pathogen damaged the germination of seeds, regardless of treatment inoculated. Both fungi are transmitted from seed to lima bean seedling, causing disease in different aerial organs.

Key-words: seed pathology, *Phaseolus lunatus*, seed health, transmission by seeds, seed preconditioning.

INTRODUÇÃO

As sementes podem abrigar e transportar de maneira eficiente, microrganismos de todos os grupos taxonômicos, patogênicos ou não, sendo, portanto excelentes veículos de dispersão (DHINGRA, 2005). Visto que 90 % das lavouras no mundo dependem do uso de sementes e, estando contaminadas, tornam-se fonte de inóculo inicial no campo, podem iniciar uma epidemia (BRASIL, 2009). A baixa qualidade de sementes é apontada como uma das principais causas para a baixa produtividade das lavouras, em razão da associação de patógenos junto às sementes apresentar reflexos negativos no processo de germinação e desenvolvimento da plântula (DHINGRA, 2005).

Em plantios de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) no Brasil, os fungos estão entre os principais agentes causadores de doenças. A antracnose causada por *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore, ocorre com frequência e é apontada como uma das principais doenças do feijão-fava, principalmente na região nordeste do Brasil, onde as condições climáticas favorecem seu desenvolvimento (PAULA JUNIOR et al., 1995).

Outro fungo que tem ação deletéria em sementes de leguminosas é *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Por ser polífago, causa doença em mais de 500 espécies botânicas (GUPTA et al., 2012), dentre elas o feijão-caupi (BIEMOND et al., 2013), a soja (ALMEIDA et al., 2014) e o feijão-comum (SARTORATO; RAVA, 1994; YOU et al., 2011). A presença de *M. phaseolina* nas sementes pode resultar em tombamento de pré ou pós-emergência em feijão-caupi (ALMEIDA et al., 2014). Em virtude de sua natureza, o fungo tem seu desenvolvimento favorecido por temperaturas elevadas e pela baixa umidade, viabilizando sua proliferação, visto que as lavouras estão sujeitas a stress hídrico, devido à escassez de água, como nas culturas da soja e feijão comum (KENDIG et al., 2000).

É fato a transmissão por sementes de todas as espécies de *Colletotrichum* patogênicas às leguminosas, contribuindo para ampla disseminação desses patógenos (LENNÉ, 1992). Como exemplo tem-se *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Magnus) Cavara, transmitido eficientemente com taxas de transmissão semente-plântula de até 80 % em *Phaseolus vulgaris* (REY et al., 2009). *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, tem taxa de transmissão para plântulas de até 5 %, sendo considerada elevada para a cultura do

algodoeiro (ARAÚJO et al., 2009). Entretanto, não existem pesquisas sobre transmissão para a plântula de *C. truncatum* e *M. phaseolina* a partir de sementes de feijão-fava.

Estudos da qualidade sanitária de sementes necessitam muitas vezes, que estas estejam infectadas por patógenos em quantidade e qualidade suficiente para condução de pesquisas. O uso de inoculação de fungos através do método da restrição hídrica tem sido usado em trabalhos que envolvem germinação, transmissão de patógenos e sanidade de sementes (MACHADO et al., 2012). A eficiência do método foi demonstrada em estudos de transmissão de *C. truncatum*, *Phomopsis sojae* e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja (MACHADO et al., 2001). A inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* utilizando solutos para modificação do meio de cultura, possibilitou a obtenção de sementes de *P. vulgaris* infectadas com taxa de transmissão de até 70 % (COSTA et al., 2003).

Diante da necessidade de obter informações sobre a transmissão semente-plântula de *C. truncatum* e *M. phaseolina*, este trabalho propôs-se verificar a transmissão destes dois patógenos a partir de sementes de feijão-fava infectadas artificialmente, assim como aplicar a técnica de restrição hídrica para obtenção de sementes de feijão-fava inoculadas.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de feijão-fava da variedade Boca de Moça foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1 %, por três minutos, seguido de duas lavagens com água destilada esterilizada. Em seguida foram submetidas aos testes de germinação e sanidade (BRASIL, 2009). Os isolados fúngicos JM 37 (*Colletotrichum truncatum*) e ESS08 (*Macrophomina phaseolina*) utilizados neste estudo foram obtidos a partir de sementes de feijão-fava em março de 2015, e preservados em glicerol a -20 °C.

O meio de cultura utilizado neste estudo foi o batata-dextrose-agar (BDA) acrescido de manitol, obtendo-se os potenciais hídricos 0,0; -0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1,0 MPa. As concentrações dos solutos para o preparo dos meios, em cada potencial hídrico, foram obtidas por meio da fórmula de Van't Hoff citado por Salisbury; Ross, (1991), ou seja: $\psi_{os} = RTC$, em que: ψ_{os} = potencial osmótico (atm); R = constante geral dos gases perfeitos ($8,32 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T = temperatura (K); C = concentração (mol L^{-1}) e $T \text{ (K)} = 273 + T \text{ (}^\circ\text{C)}$. O meio BDA, após adição do manitol em cada concentração, foi autoclavado a 121 °C por 20 min e distribuído em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Em cada placa foram adicionados três discos de BDA contendo estruturas de cada fungo (*C. truncatum* ou *M. phaseolina*). As placas foram incubadas em fotoperíodo de 12 h, e temperatura de 25 ± 2 °C, até o crescimento total do fungo. Em seguida, 40 gramas de sementes foram distribuídas sobre o micélio fúngico e levemente pressionadas, permanecendo por diferentes períodos de exposição, em função do tratamento.

O experimento foi composto por sete tratamentos, com cinco repetições cada. Os tratamentos consistiram em diferentes binômios potencial hídrico/tempo de exposição das sementes, sendo: T1. 0,0 MPa sem inóculo por 48 horas; T2. 0,0 MPa com inóculo por 48 horas; T3. - 0,2 MPa por 48 horas; T4. -0,4 MPa por 48 horas; T5. -0,6 MPa por 72 horas; T6. - 0,8 MPa por 96 horas e T7. -1,0 MPa por 120 horas. Os parâmetros avaliados foram teste de germinação em rolo de papel, emergência de plântulas em areia e teste de sanidade de sementes.

Teste de germinação em rolo de papel: após incubação das sementes em meio de cultura osmoticamente modificado, estas foram acondicionadas em folhas de papel filtro estéril, em um total de 25 sementes por tratamento, com 16 repetições. Os rolos foram umedecidos com água destilada esterilizada na

proporção de 2,5 vezes o peso do papel; sendo mantidas em câmara incubadora a 25 ± 2 °C por sete dias, e umedecidos quando necessário. Foram registradas as sementes germinadas e sementes mortas (BRASIL, 2009).

Teste de emergência em areia: foi realizado em bandejas plásticas de 47 x 27 x 08 cm, contendo areia esterilizada em autoclave (121 °C por duas horas). Foram utilizadas 100 sementes por tratamento, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1 % por um minuto e enxaguadas em água destilada esterilizada, semeadas na profundidade aproximada de 1,5 cm. As bandejas foram distribuídas ao acaso em casa de vegetação. As avaliações foram realizadas aos sete, 14 e 21 dias após a semeadura (D.A.S.). Foram avaliados o número de plântulas emergidas e incidência das doenças. Aos 14 DAS para (*M. phaseolina*) e aos 21 DAS (para *C. truncatum*), as plântulas foram arrancadas, avaliadas, e fragmentos de órgãos sintomáticos para infecção fúngica, foram plaqueados em meio BDA para constatação da presença do fungo. Os dados relativos a transmissão do fungo da semente para a plântula foram expressos em porcentagem para cada órgão vegetal avaliado em função da incidência do fungo conforme Barba et al. (2002).

Teste de sanidade: foram utilizadas seis sementes por placa de Petri de 15 cm de diâmetro, totalizando 120 sementes por tratamento, as quais foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1 % por um minuto e enxaguadas em água destilada esterilizada. Posteriormente foram plaqueadas em meio BDA e mantidas em incubadora a 25 ± 2 °C, em regime alternado de 12 horas de luz. A avaliação ocorreu em até sete dias após a semeadura por análise visual e com auxílio de microscópio estereoscópico (SUTTON, 1980).

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5 %. A análise estatística foi realizada por ANOVA no programa ASSISTAT versão 7.7 beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados do teste de germinação em rolo de papel evidencia-se que o aumento do potencial hídrico / tempo promoveu redução gradual na porcentagem de sementes germinadas e consequente aumento do número de sementes mortas (Figura 1).

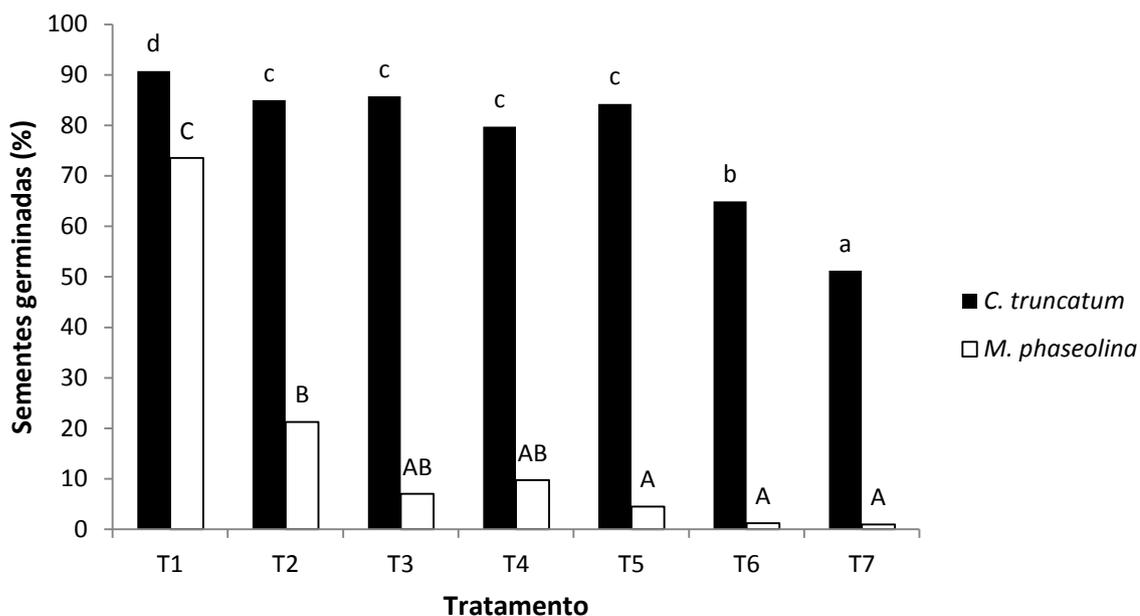


Figura 1. Germinação em rolo de papel de sementes de feijão-fava inoculadas com *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* em diferentes tratamentos (potenciais hídricos e tempo de exposição ao fungo). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 %. T1. 0,0 MPa sem inóculo por 48 horas; T2. 0,0 MPa com inóculo por 48 horas; T3. - 0,2 MPa por 48 horas; T4. -0,4 MPa por 48 horas; T5. -0,6 MPa por 72 horas; T6. - 0,8 MPa por 96 horas e T7. -1,0 MPa por 120 horas.

Não houve diferença estatística ($P < 0,05$) dos tratamentos T3, T4 e T5 quando comparado com o controle inoculado (T2), apresentando elevadas taxas de germinação (Figura 1). Nesses tratamentos, a presença do fungo pouco afetou o poder germinativo das sementes. T6 e T7 foram os tratamentos que promoveram a maior mortalidade de sementes. Potenciais osmóticos de -0,8 MPa ou superiores e tempos a partir de 96 horas frequentemente inibem a germinação de sementes de outras espécies vegetais, como é o caso das sementes de algodão inoculadas com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (ARAÚJO et al., 2012) e sementes de soja inoculadas com *C. truncatum* (MACHADO et al., 2001). O binômio que menos

interferiu na germinação das sementes de soja foi $-0,4$ MPa / 48 horas (MACHADO et al., 2001).

Quando as sementes foram inoculadas com *M. phaseolina*, independente do tempo de exposição e da presença (T3, T4, T5, T6 e T7) ou ausência de potencial hídrico (T2) houve acentuada redução da germinação, para menos de 10 % a partir do T2 (Figura 1). A germinação das sementes caiu de 73,5 % no tratamento não inoculado (T1); para 21,2 % no tratamento inoculado (T2), ou seja, a presença do fungo, mesmo sem o auxílio do restritor hídrico, causou a morte das sementes, mesmo antes de iniciar o processo germinativo. Em sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*), a partir de 48 horas de exposição ao fungo *Botryodiplodia theobromae*, ocasionou redução de 80 % da germinação, aumentando para 100 % quando concentrações de manitol foram acima de $-0,6$ Mpa e 72 horas de exposição (MACHADO et al., 2004).

No teste de emergência de plântulas ocorreu diminuição do número de plantas emergidas à medida que o nível de restrição hídrica e tempo de exposição foi aumentado (Figura 2), semelhante ao que ocorreu no teste de germinação em rolo de papel (Figura 1).

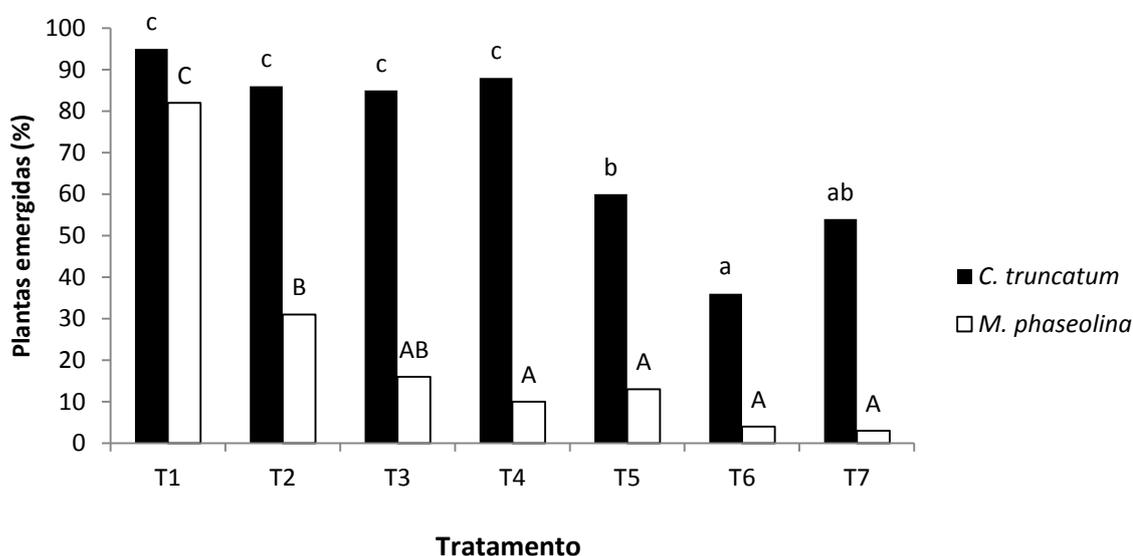


Figura 2. Emergência em areia de plântulas de feijão-fava a partir de sementes inoculadas com *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* em diferentes tratamentos (potenciais hídricos e tempo de exposição ao fungo). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 %. T1. 0,0 MPa sem inóculo por 48 horas; T2. 0,0 MPa com inóculo por 48 horas; T3. $-0,2$ MPa por 48 horas; T4. $-0,4$ MPa por 48 horas; T5. $-0,6$ MPa por 72 horas; T6. $-0,8$ MPa por 96 horas e T7. $-1,0$ MPa por 120 horas.

Para *C. truncatum*, os tratamentos T2, T3 e T4 não diferiram do tratamento controle não inoculado (T1), com porcentagem média de emergência de 88,5 % nestes tratamentos, demonstrando que a elevação do potencial hídrico não interferiu com o desenvolvimento da plântula. O tratamento com menor percentual de germinação foi o T6, com apenas 36 % de plântulas emergidas (Figura 2).

Além disso, a sanidade das plantas avaliadas aos 7, 14 e 21 DAS com as sementes inoculadas com *C. truncatum* revelou que os sintomas (manchas em cotilédones, caule e folhas) ocorrem inicialmente aos 7 DAS e tornam-se mais severos aos 14 e 21 DAS (Figura 3A). Aos 7 DAS a incidência de sintomas foi mais frequente nos tratamentos T4 e T5 ($P < 0,05$), diminuindo nos tratamentos T6 e T7 (Figura 3A). Aos 14 DAS não houve diferença entre os tratamentos inoculados ($P < 0,05$). Aos 21 DAS houve, de forma geral, aumento na incidência dos sintomas, e não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos T4, T6 e T7. Esses resultados, somados aqueles da emergência em areia indicam o potencial T4 (-0,4 MPa e 48 horas de exposição), como o melhor tratamento para inoculação de *C. truncatum*, pois não interferiu na germinação das sementes e possibilitou a maior incidência de sintomas nas plantas.

Resultados semelhantes foram encontrados em sementes de algodão inoculadas com *C. gossypii* var. *cephalosporioides*, que apresentaram redução no número de plântulas emergidas 7 DAS nos tratamentos em que a restrição hídrica foi de -0,8 e -1,0 MPa. Em nova análise aos 21 DAS, não foram encontradas diferenças significativas, porém houve redução do número final de plantas em todos os tratamentos quando comparados com a testemunha (MACHADO et al., 2004).

Para as sementes inoculadas com *M. phaseolina* houve redução na porcentagem de plântulas emergidas em todos os tratamentos, em comparação ao T1 (Figura 2). No tratamento T1 houve 82 % de emergência de plântulas e apenas 31 % no tratamento T2, e valores menores nos tratamentos seguintes, demonstrando que o fungo tem a capacidade de penetrar eficientemente e matar a semente na ausência do restritor, onde o tempo de 48 horas parece ser suficiente para o estabelecimento da infecção fúngica, o que corrobora com os resultados do teste de germinação (Figura 1).

Resultados semelhantes foram obtidos em sementes de soja inoculadas com o também fungo habitante de solo *S. sclerotiorum*, o qual provocou redução de 32 % na emergência em comparação ao controle não inoculado (MACHADO et al., 2001).

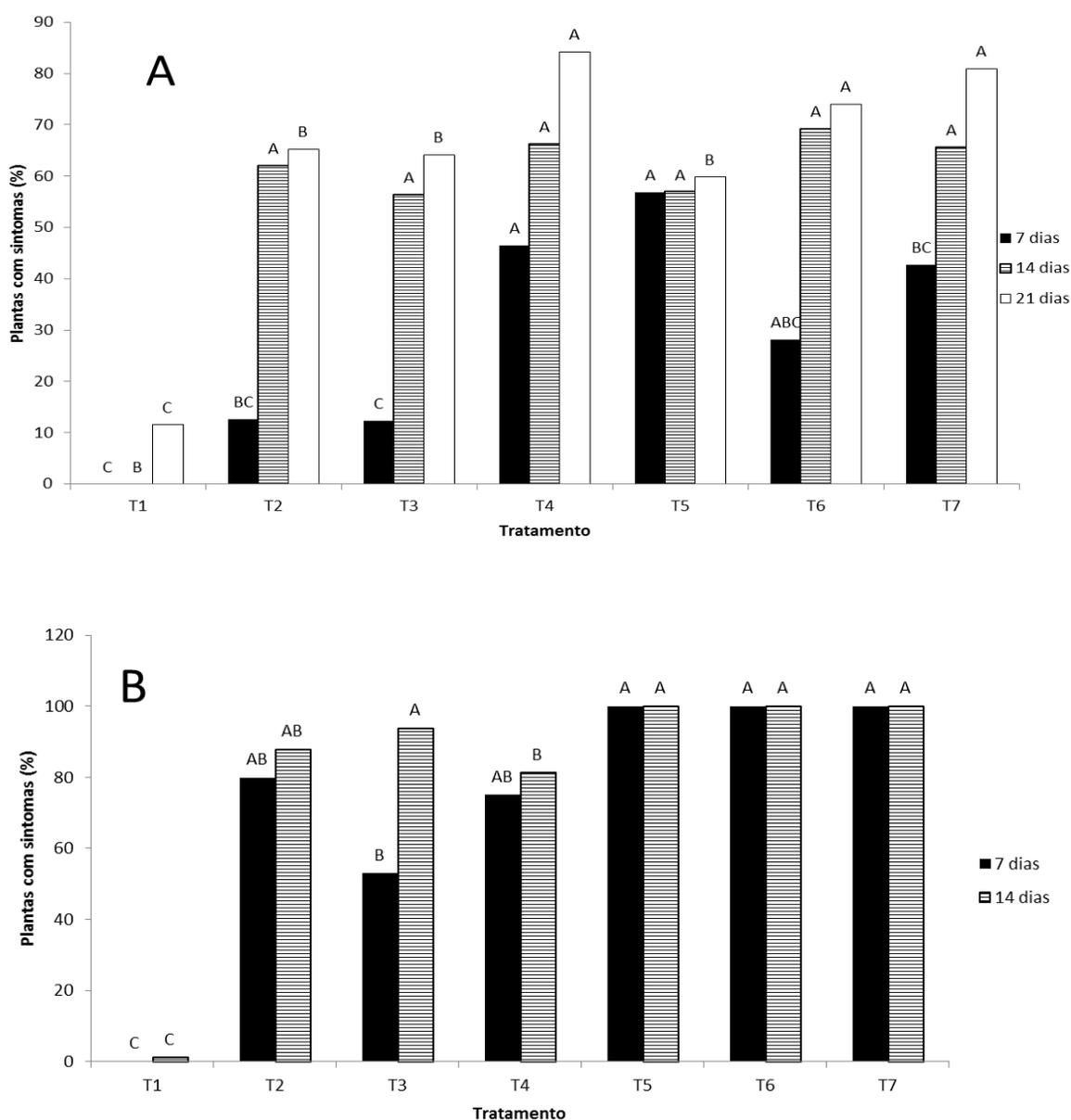


Figura 3. Plântulas de feijão-fava com sintomas provocados pela infecção de *Colletotrichum truncatum* (A) e *Macrophomina phaseolina* (B) em diferentes tratamentos (potencial hídrico e tempo de exposição ao fungo). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 %. T1. 0,0 MPa sem inóculo por 48 horas; T2. 0,0 MPa com inóculo por 48 horas; T3. -0,2 MPa por 48 horas; T4. -0,4 MPa por 48 horas; T5. -0,6 MPa por 72 horas; T6. -0,8 MPa por 96 horas e T7. -1,0 MPa por 120 horas.

Não foi possível avaliar os sintomas aos 21 DAS para *M. phaseolina* devido à elevada incidência e severidade dos sintomas, ocasionando morte das plântulas (Figura 3B). Logo aos 7 DAS houve comprometimento da sanidade das plântulas, independente do tratamento, com 79,8 % de plantas com sintomas mesmo no tratamento sem adição de restritor hídrico e exposição ao fungo por 48 horas. Os tratamentos T5, T6 e T7 apresentaram 100 % de plantas doentes. Resultado mantido também na segunda avaliação aos 14 DAS.

Esses resultados, juntamente com aqueles da emergência em areia revelaram que a metodologia utilizada foi eficaz para a obtenção de sementes de feijão-fava inoculadas com *M. phaseolina*, mas, devido à elevada agressividade do patógeno, que parece deteriorar rapidamente a semente, os parâmetros utilizados podem não ter sido os adequados, sendo necessário realizar novos experimentos com tempos de exposição abaixo de 48 horas. Elevada agressividade de *M. phaseolina* foi comprovada após inoculação de sementes de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) com 96 isolados do patógeno obtidos em diversos países, dentre eles o Brasil (REYES-FRANCO et al., 2006). Altos percentuais de redução na emergência de plântulas também foram observados em plântulas de canola (*Brassica napus* L.) (77 %) e níger (*Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass) (63 %), as quais tiveram as sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* (VENTUROSOSO et al., 2014).

Visando garantir que os sintomas observados nas plântulas fossem de fato provocados por *C. truncatum* e *M. phaseolina*, diferentes órgãos sintomáticos foram coletados de 10 % das plântulas dentro de cada tratamento após a última avaliação (21 DAS para *C. truncatum* e 14 DAS para *M. phaseolina*). Das plântulas emergidas a partir de sementes inoculadas com *C. truncatum* foi possível reisolar o fungo dos cotilédones, pecíolos, caules e folhas, com percentuais médios de 58,2, 35,8, 33,2 e 56,4 %, respectivamente (Tabela 1A), o que atesta tanto a eficiência do método de restrição hídrica na inoculação de sementes de feijão-fava, como o fato do patógeno ser transmitido da semente para as plântulas.

Os percentuais médios de 76,7, 55,3 e 30,5 % foram obtidos das plântulas emergidas a partir de sementes inoculadas com *M. phaseolina*, respectivamente, nos cotilédones, caules e folhas (Tabela 1B).

Porcentagens menores de plantas doentes foram encontradas por Barba et al. (2002), que buscando verificar a transmissão de *Bipolaris sorokiniana* de sementes para plântulas de cevada (*Hordeum vulgare* L.), encontraram órgãos aéreos e

radiculares, afetados pela presença do fungo em coleótilos (40 %), extremidade apical e região subterrânea com percentual de 38,6 e 48,1 %, respectivamente, além de bainhas (31,6 %), plúmulas (8,1 %) e mesocótilos (28,1 %).

Tabela 1. Porcentagem de *Colletotrichum truncatum* (A) e *Macrophomina phaseolina* (B) recuperados a partir de órgãos sintomáticos de plântulas de feijão-fava emergidas após inoculação das sementes submetidas a diferentes potenciais hídricos. Teresina, 2016

(A)	Tratamento	Cotilédones	Pecíolo	Caule	Folha
	T1*	0,0	1,0	18,0	18,1
	T2	26,3	20,0	20,0	31,4
	T3	48,1	30,0	15,0	40,0
	T4	71,8	35,0	30,0	57,1
	T5	86,1	35,0	60,0	74,2
	T6	96,8	55,0	45,0	80,0
	T7	78,5	75,0	45,0	94,2
	Média (%)	58,2	35,8	33,2	56,4
(B)					
	T1	0,0	NA**	0,0	0,0
	T2	62,5	NA	40,0	10,0
	T3	100,0	NA	70,0	10,0
	T4	90,0	NA	83,3	50,0
	T5	84,6	NA	100,0	76,9
	T6	100,0	NA	44,4	66,6
	T7	100,0	NA	50,0	0,0
	Média (%)	76,7	-	55,3	30,5

* T1. 0,0 MPa sem inóculo por 48 horas; T2. 0,0 MPa com inóculo por 48 horas; T3. - 0,2 MPa por 48 horas; T4. -0,4 MPa por 48 horas; T5. -0,6 MPa por 72 horas; T6. - 0,8 MPa por 96 horas e T7. -1,0 MPa por 120 horas. ** (NA) - não avaliado.

Pelos resultados do teste de sanidade em meio BDA, para os dois patógenos avaliados, foi possível observar que o inóculo de ambos penetrou nas sementes em todos os binômios (potencial hídrico / tempo), provocando infecção (Figura 4). Sementes inoculadas com *C. truncatum*, no T7, apresentaram a maior incidência (52,5 %). Neste tratamento, porém, houve elevada incidência de sementes não germinadas, inviabilizando seu uso para a obtenção de sementes infectadas pelo patógeno. Pode-se observar que nos tratamentos T4 e T5 houve incidência fúngica de cerca de 38,7 %; soma-se a este resultado, o fato destes tratamentos terem pouco prejudicado a germinação das sementes e a emergência das plântulas (Figuras 1 e 2).

Diferente disso, sementes de soja inoculadas com *S. sclerotiorum* por 24 horas de exposição em qualquer dos potenciais hídricos testados (-0,3, -0,6 e -0,9 MPa) não tiveram sua germinação afetada, sendo suficiente para se atingir níveis de infecção satisfatórios, não restringindo o crescimento do fungo, nem tampouco a viabilidade das sementes para armazenamento (REIS et al., 2014).

Sementes inoculadas com *M. phaseolina* apresentaram elevadas incidências, alcançando 97,5 % no T7 (Figura 4). A menor incidência entre os tratamentos inoculados foi de 66,7 % no T2. Nota-se que o menor tempo de inoculação utilizado foi eficiente na inoculação de *M. phaseolina* em sementes de feijão-fava.

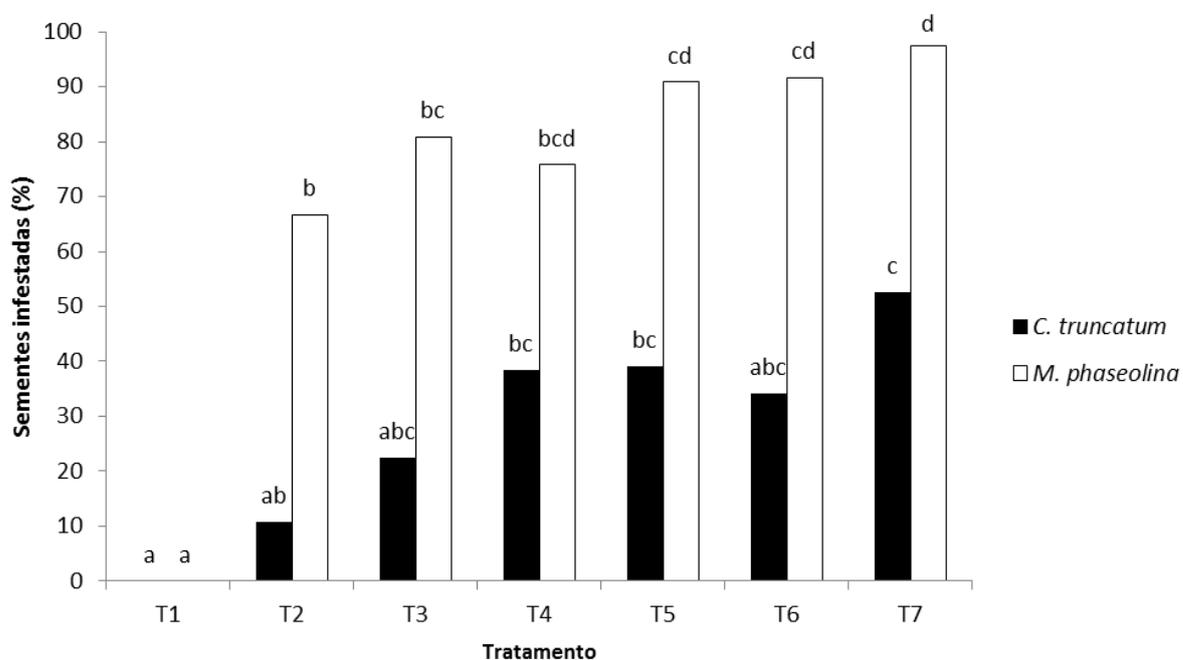


Figura 4. Porcentagens de *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* em sementes de feijão-fava, detectados pelo teste de sanidade em meio batata-dextrose-agar em diferentes tratamentos (potenciais hídricos e tempo de exposição). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 %. T1. 0,0 MPa sem inóculo por 48 horas; T2. 0,0 MPa com inóculo por 48 horas; T3. - 0,2 MPa por 48 horas; T4. -0,4 MPa por 48 horas; T5. -0,6 MPa por 72 horas; T6. - 0,8 MPa por 96 horas e T7. -1,0 MPa por 120 horas.

Constata-se que o uso da restrição hídrica foi eficaz na obtenção de sementes de feijão-fava infectadas com *C. truncatum* para condução de pesquisas que necessitem de sementes infectadas, como em estudos de tratamento químico de sementes, epidemiologia, desenvolvimento de métodos de detecção de patógenos. Entretanto, faz-se necessário o estabelecimento de tempos adequados,

aparentemente inferiores a 48 horas de exposição a *M. phaseolina*, em razão da inviabilidade de sementes, quando exposta a períodos elevados.

CONCLUSÕES

Há transmissão de *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* da semente para as plântulas de feijão-fava.

O pré-condicionamento osmótico foi eficaz na obtenção de sementes de feijão-fava infectadas com *C. truncatum* e *M. phaseolina*, entretanto a inoculação de sementes de feijão-fava com *M. phaseolina* com períodos acima de 48 horas, acarreta a morte das sementes.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A. **Macrophomina phaseolina em soja**. Embrapa Soja. Londrina, n. 346, 55 p., 2014.
- ARAÚJO, A. E.; MENTEN, J.O.M; DIAS, C. T. S.; CZERMAINSKI, A. B. C.; SANTOS, J. W.; MORAES, M. H. D. Efeito de restritores hídricos sobre a germinação, comprimento da radícula e níveis de detecção de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes de algodão. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 79-83, 2012.
- ARAÚJO, A. E.; MENTEN, J. O. M.; FERREIRA, A. C. B.; DIAS, C. T. S.; NÓBREGA, M. B. M.; MORELLO, C. L. Efeito de diferentes níveis de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa, em plantas de algodão no campo e sua incidência nas sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 310-315, 2009.
- BARBA, J. T, REIS, E.M.; FORCELINI, C.A. Efeito da temperatura e de fungicida na transmissão de *Bipolaris sorokiniana* da semente para plântulas de cevada. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27, n. p. 500-507, 2002.
- BIEMOND, P. C.; OGUNTADE, O.; KUMAR, P. L.; STOMPH, T. J.; TERMORSHUIZEN, A. J.; STRUIK, P. C. Does the informal seed system threaten cowpea seed health? **Crop Protection**, Guildford, v. 43, p. 166-174, 2013.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 200 p., 2009.
- COSTA, M. L. N.; MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R. M.; POZZA, E. A.; ORIDE, D. Inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro através de restrição hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1023-1030, 2003.
- DHINGRA, O. D. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In.: ZAMBOLIM, L. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa, p. 75-104, 2005.
- GUPTA, G. K.; SHARMA. S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, Maldem, v. 160, n. 1, p. 167-180, 2012.
- HEYDCKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, London, v. 246, n. 5427, p. 42-44, 1973.
- KENDIG, S. R.; RUPE, J. C.; SCOTT, H. D. Effect of irrigation and soil water stress on densities of *Macrophomina phaseolina* in soil and roots of two soybean cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 895–900, 2000.

- LENNÉ, J. M. *Colletotrichum* Diseases of Legumes. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. England, p. 134-166, 1992.
- MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N.; GUIMARÃES, R. M.; MACHADO, C. F. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, n. 1, p. 37-63, 2012.
- MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 95-101, 2001.
- MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A.; VIEIRA, M. G. G. C.; ALVES, M. C. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 62-67, 2004.
- PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, M. B.; VIEIRA, R. F. Doenças causadas por fungos em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 182, p. 63-71, 1995.
- REY, M. S. Transmissão semente-plântula de *Colletotrichum lindemuthinum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 465-470, 2009.
- REIS, G. F. ; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; HIRATA, L. M.; PONTIM, B. C. A. Viabilidade de armazenamento de sementes de soja inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* em meio com restrição hídrica. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 2, p.168-173, 2014.
- REYES-FRANCO, M. C.; DELGADO, H. S.; FERNANDEZ, B. R.; FERNANDEZ, M. M.; SIMPSON, J.; PEREZ, M. N. Pathogenic and Genetic Variability within *Macrophomina phaseolina* from México and Other Countries. **Journal of Phytopathology**, Maldem, v. 154, p. 447–453, 2006.
- SALISBURY, F. B; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Belmont. 682 p., 1991.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, Doc. 50, 300 p., 1994.
- SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Common wealth Mycological Institute, London, 696 p., 1980.
- VENTUROSOSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L.; VENTUROSOSO, L. A. C.; PONTIM, B. C. A.; REIS, G. F. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 5, p. 788-793, 2014.
- YOU, M. P.; COLMER, T. D.; BARBETTI, M. J. Salinity drives host reaction in *Phaseolus vulgaris*(common bean) to *Macrophomina phaseolina*. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 38, p. 984-992, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho encontrou resultados importantes sobre a população fúngica de sementes de feijão-fava, uma vez, que informações desta natureza, para esta espécie são escassas. A partir disso poderão ser conduzidos experimentos que visem o controle de fitopatógenos transmitidos por sementes. O controle químico de sementes é uma possibilidade viável, no entanto ainda não há no mercado defensivos químicos registrados no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), destinados ao tratamento de sementes ou de plantas de feijão-fava.

A informação de que os fungos *Colletotrichum truncatum* e *Macrophomina phaseolina* são transmitidos da semente para plântula é de suma importância, já que ambos os patógenos podem prejudicar a germinação da semente e o desenvolvimento vegetal, além de poderem ser introduzidos em áreas de cultivo. Estes resultados podem subsidiar novas pesquisas, como o estudo de medidas que visem controlar o estabelecimento de inóculo inicial, entender os mecanismos de infecção e de que forma ocorre a transmissão, podendo garantir maior rendimento e consequentemente menores perdas nas lavouras.

No entanto, são necessários mais estudos para estabelecer tempos de exposição das sementes mais adequados à incubação com *M. phaseolina*, uma vez que neste estudo o menor tempo utilizado - 48 horas - foi prejudicial, levando a morte das sementes.

APÊNDICE – TABELA DE ACESSOS

Descrição dos acessos de feijão-fava utilizados neste estudo, com seus respectivos códigos, procedências e ano de obtenção. Teresina, 2016

Nº Acesso	Procedência	Ano de obtenção	Características
UFPI 880	Puxinanã, PB	2015	Nome comum: fava mestiça. Cor: bege com manchas de cor vinho e regiões mosqueadas com a mesma cor. Formato: alongado.
UFPI 881	Matões, MA	2015	Nome comum: boca-de-moça. Cor: bege com manchas marrom e castanho próximas ao hilo. Formato: achatado/alongado.
UFPI 883	Esperantina, PI	2014	Nome comum: fava branca. Cor: branca, formato: achatado.
UFPI 884	Salitre, CE	2015	Nome comum: fava mosquito. Cor: bege e vermelha, mosqueada com manchas por toda sementes. Formato: achatado.
UFPI 885	Presidente Dutra, MA	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: levemente arredondado.
UFPI 886	Novo Oriente, CE	2015	Nome comum: orelha de jó. Cor: branca com manchas pretas. Formato: achatado.
UFPI 888	Tianguá, CE	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: achatado.
UFPI 889	Paraibano, MA	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: achatado.
UFPI 890	Bocaina, PI	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: achatado.
UFPI 891	Uruçuí, PI	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: achatado.
UFPI 892	São Gonçalo, PI	2015	Nome comum: fava manteiga. Cor: marrom. Formato: arredondado.
UFPI 893	São Gonçalo, PI	2015	Nome comum: boca-de-moça. Cor: bege com manchas marrom e castanho próximas ao hilo. Formato: achatado/alongado.
UFPI 894	Esperantina, PI	2015	Nome comum: boca-de-moça. Cor: bege com manchas marrom e castanho próximas ao hilo. Formato: achatado/alongado.
UFPI 895	José de Freitas, PI	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: arredondado.
UFPI 896	Crateús, CE	2015	Nome comum: fava mulatinha. Cor: marrom claro. Formato: arredondado.
UFPI 897	Fagundes, PB	2015	Nome comum: fava eucalipto. Cor: bege. Formato: levemente achatado.
UFPI 898	Pocinhos, PB	2015	Nome comum: fava branca graúda. Cor: branca. Formato: achatado.
UFPI 899	Lagoa Seca, PB	2015	Nome comum: orelha de jó. Cor: branca com manchas pretas. Formato: achatado.
UFPI 900	Areias, PB	2015	Nome comum: fava roxa. Cor: roxa. Formato: redondo.
UFPI 902	São Benedito, CE	2015	Nome comum: fava feijão. Cor: bege clara com manchas mosqueadas moderadamente de cor vermelha em torno do hilo e no corpo da semente. Formato: arredondado.
UFPI 903	São Benedito, CE	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca. Formato: achatado.
UFPI 904	Parambú, CE	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca.

UFPI 905	Pedra Branca, CE	2015	Formato: achatado Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 906	Crateús, CE	2015	Formato: achatado. Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 907	Tauá, CE	2015	Formato: levemente arredondada. Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 908	Pedra Branca, CE	2015	Formato: achatado. Nome comum: fava manteiga. Cor: marrom.
UFPI 910	Pedro II, PI	2015	Formato: arredondado. Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 911	Teresina, PI	2015	Formato: arredondado. Nome comum: fava mestiça vermelha.
UFPI 912	Passagem Franca, PI	2015	Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 913	Amarante, PI	2015	Formato: achatado. Nome comum: boca-de-moça. Cor: bege com manchas marrom e castanho próximas ao hilo.
UFPI 914	Chapada Grande, PI	2015	Formato: achatado/alongado. Nome comum: boca-de-moça. Cor: bege com manchas marrom e castanho próximas ao hilo.
UFPI 915	Miguel Alves, PI	2015	Formato: achatado/alongado. Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 916	Colinas, MA	2015	Formato: achatado. Nome comum: fava branca. Cor: branca.
UFPI 923	Tanque, PI	2015	Formato: achatado. Nome comum: boca-de-moça. Cor: bege com manchas marrom e castanho próximas ao hilo.
			Formato: achatado/alongado.