



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



DAYANNE FABRÍCIO BRESSAN

**USO DOS ELICIADORES ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E HARPINA
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO
COMUM AO CRESTAMENTO BACTERIANO**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2011

DAYANNE FABRÍCIO BRESSAN

**USO DOS ELICIADORES ACIBENZOLAR-S-METÍLICO E HARPINA
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE FEIJOEIRO
COMUM AO CRESTAMENTO BACTERIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Co-orientador: Dr. Fernando Broetto

PATO BRANCO

2011

Catálogo na Fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

B843u Bressan, Dayanne Fabrício

Uso dos eliciadores acibenzolar-s-metílico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao cretamento bacteriano / Dayanne Fabrício Bressan. – 2011.

64 p. : Il.; 30 cm.

Orientador: José Abramo Marchese

Co-orientador: Fernando Broetto

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2011.

Bibliografia: f. 55-61

1. *Phaseolus vulgaris* L. 2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* 3. indutores de resistência. I. Marchese, José Abramo, orient. II. Broetto, Fernando, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD(22. ed.) 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Pato Branco
Gerência de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 044

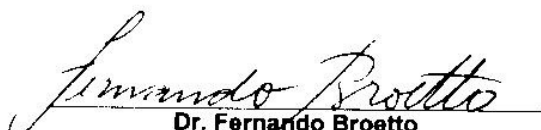
Uso dos eliciadores acibenzolar-s-metílico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao crestamento bacteriano

por


Dayanne Fabrício Bressan


Dissertação apresentada às oito horas e trinta minutos do dia vinte e quatro de março de dois mil e onze, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus Pato Branco*. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho. *aprovado..*

Banca examinadora:


Dr. Fernando Broetto
UNESP


Dra. Marisa de Cacia Oliveira
UTFPR


Dr. Idalmir dos Santos
UTFPR


Dr. José Abramo Marchese
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Idemir Citadin
Coordenador do PPGAG

*Dedico, a Deus,
aos meus pais e ao meu irmão,
fonte inesgotável do meu amor!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e iluminado meu caminho acompanhado de coragem para enfrentar os desafios da vida nos caminhos que escolhi.

Ao meu orientador Professor Dr. José Abramo Marchese, pelos seus ensinamentos e excelente orientação, o grande responsável pelo meu aprendizado dentro da pesquisa, sempre dando um jeitinho para que nada faltasse. Agradeço pela paciência, críticas e pelo modo como me apoiou nesta jornada, sempre estimulando as nossas capacidades e a importância da união do trabalho em equipe. A sua disponibilidade que sempre manifestou, e a empatia com que recebeu minhas dúvidas, idéias e necessidades, mostrando que é possível exercer o amor em todos os nossos atos. Além de ensinar, tornou-se um grande amigo. MUITÍSSIMO Obrigada!

Aos meus pais, que de vocês recebi o dom mais precioso a “vida”, revestindo toda ela de carinho, amor e dedicação, sempre me apoiando, ensinando, compreendendo, tendo sempre o estudo e o meu bem estar em primeiro lugar. Sem os seus esforços e seus exemplos de humildade e dignidade eu não teria chegado até aqui! Eternamente grata. Amo Vocês!

Ao meu irmão, que durante toda a sua luta pela vida, demonstrou exemplo de força, coragem e perseverança, para nunca desistir diante do primeiro obstáculo encontrado. Motivo dessa persistência e desta obra. Amo você!

Aos meus avós João Bressan e Alice Bressan (in-memorian), Antônio Nogueira (in-memorian) e Noemia Nogueira que mesmo cansados pela idade avançada, nunca me negaram um ensinamento ou uma palavra de apoio numa hora difícil, sempre acreditaram na importância dos estudos para seus filhos e netos e que sempre se orgulham das minhas conquistas. Muito obrigada!!

Ao meu namorado Diogo Capelin, que por mais que eu tentasse eu não conseguiria terminar esse trabalho sem sua ajuda. Pelos sábados, domingos, férias e feriados que passou me auxiliando no laboratório. Do seu tempo e sua sabedoria que compartilhou horas e horas de estudo para me ajudar, sempre acreditando no meu potencial. Juntos dividimos as lágrimas e os momentos felizes que passamos. Sou muito grata a você, ter sua companhia é o mesmo que estar vivendo com a certeza que existem pessoas que realmente se importam conosco, as quais sabem dizer palavras certas em momentos mais difíceis. Obrigada por ser parte da minha vida. Te amo!.

A minha Tia Dra. Cleide Nogueira, que sempre me ajudou e me apoiou nos momentos eu que eu mais precisei, acreditando na importância dos meus valores e meus estudos. A minha Tia Terezina por suas orações e infinita crença na capacidade da realização deste trabalho. E a todos os meus familiares paternos e maternos aqui não citados, porém não

menos importantes, que de forma direta ou indiretamente contribuíram para concretização dessa jornada sempre me apoiando com seus exemplos de amor e fé em Deus.

A minha amiga Dra. Catarine dos Santos, pela verdadeira e duradoura amizade, que ao longo desses 17 anos, compartilhou junto os momentos das grandes conquistas, alegrias, tristezas e dificuldades, demonstrando que as verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. Agradeço pelo apoio, pelas palavras árduas e amáveis nos momentos difíceis e por sempre acreditar no meu potencial, na minha profissão, nas minhas idéias, nos meus devaneios, principalmente quando nem eu mais acreditava.

As minhas queridas amigas Michele Jamille e Gabrielle Chiarani, por fazerem parte dessa conquista e pelo carinho e afeto que vocês depositaram em mim durante esses anos. Jamais esquecerei as palavras confortadoras.

Aos pais da Gabi, Rose e Nelson Chiarani que me acolheram em seu lar nos primeiros momentos que cheguei a esta cidade. Nunca terei como agradecer o apoio que vocês me ofereceram em um momento em que eu tanto precisei.

A Elisângela e Andréia, por serem pessoas maravilhosas e que apareceram na hora mais difícil da minha jornada, que compartilharam um cantinho de seu lar, dividindo os momentos de alegrias e tristezas, as contas, e os problemas que encontramos durante esses dois anos de convívio.

Aos amigos especiais e companheiros do laboratório, Marcos, Rafa, Tiago, Poly, Amanda, Douglinhas, Cris, Sabrina, Douglas, Elouize, Jéssica, digo a vocês, que mesmo que o destino nos leve a caminhos diferentes nossas lembranças ficarão guardados em nossa memória e em nossos corações. E por onde passarmos, sempre “haverá os amigos que levam muito, mas não haverá os que não deixam nada”! Sem a cumplicidade de vocês, nada disso seria possível, Muito Obrigada!

Aos professores, Marisa Cácia de Oliveira e Fernando Broetto, pelo tempo disponibilizado nas correções de meu trabalho, pelo carinho e amizade e por seus ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento.

Aos funcionários Sr. Otávio (Tratorista) e o Sérgio, por sua simplicidade e humildade e dedicação na ajuda do meu trabalho.

Agradeço à UTFPR, ao corpo docente do PPGAG e a secretária Polyane Mayer que sempre cuidou das partes burocráticas para a concretização dessa jornada.

A CAPES, pela bolsa de auxílio.

*“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria a gente aprende com a vida e com os humildes”*

Cora Coralina

RESUMO

BRESSAN, Dayanne Fabrício. Uso dos eliciadores acibenzolar-S-metílico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao crestamento bacteriano. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

O crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, é uma das principais doenças da cultura do feijoeiro. Em busca por alternativas no controle de doenças em plantas, o uso de eliciadores/indutores de resistência tem sido explorado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência dos eliciadores harpina e acibenzolar-S-metílico na indução de mecanismos de defesa em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ao crestamento bacteriano comum, causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, avaliando-se possíveis alterações no processo de trocas gasosas e ativação das principais enzimas envolvidas na defesa vegetal - peroxidase, superóxido dismutase, além de proteínas e fenóis. Foram utilizadas sementes dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri. Depois de emergidas as primeiras folhas trifoliadas na fase vegetativa (V3) as plantas, foram tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico, harpina e água destilada (controle). Sete dias após a primeira aplicação dos eliciadores, foi inoculado o patógeno nas folhas do feijoeiro. A avaliação da severidade foi realizada a cada 10 dias sendo a primeira avaliação realizada 15 dias após a inoculação do patógeno. As leituras de fotossíntese foram realizadas 40 dias após a inoculação quando os sintomas e danos da doença demonstravam-se estabelecidos. Para a realização das análises bioquímicas, amostras de tecidos foliares de cada tratamento foram coletadas 24 horas antes, 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos eliciadores. Também, foram determinados o rendimento e seus componentes em ambas as cultivares. A aplicação de ASM e harpina proporcionou redução na severidade da doença do crestamento bacteriano comum nas plantas de feijoeiro da cultivar IPR-Colibri e a mesma tendência foi observada para a cultivar IAPAR 31 tratada com ASM. As plantas da cultivar IAPAR 31 tratadas com o eliciador ASM, apresentaram maiores taxas de assimilação de CO₂ quando comparadas ao controle e a mesma tendência foi observada para a cultivar IPR-Colibri. A aplicação do ASM promoveu o aumento da atividade da enzima antioxidativa peroxidase e a indução da síntese de compostos fenólicos e especialmente na cultivar suscetível IPR-Colibri. Para o rendimento de grãos e seus componentes, não foram observadas diferenças significativas entre o controle e os eliciadores ASM e harpina. Os eliciadores ASM e harpina induziram os mecanismos de resistência em feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, indicando a potencialidade do uso dos eliciadores na cultura do feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris* L.. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Indutores de resistência. Fotossíntese. Peroxidase. Superóxido dismutase. Fenóis totais. Proteínas solúveis totais.

ABSTRACT

BRESSAN, Dayanne Fabricio. The use of the elicitors Acibenzolar-S-methyl and Harpina in the inducement of resistance in common bean plants against bacterial blight. 64 f. Thesis (Master in Agronomy) – Post-Graduation Program in Agronomy (Concentration Area: Plant Production), Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2011.

The common bacterial blight, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* is one of the major diseases of the bean crops. In search for alternatives to control the plant diseases, the use of the elicitors / inductors of resistance has been explored. Thus, the objective of this work was to verify the effectiveness of the elicitors harpina and acibenzolar-S-methyl in the induction of the defense mechanisms in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) against common bacterial blight caused by *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, evaluating the possible changes in the process of gas exchange and the activation of the key enzymes involved in the plant defense - peroxidase, superoxide dismutase, besides proteins and phenols. It was used seeds from IAPAR 31 and IPR Colibri cultivars. After emerged the first trifoliolate leaves in the vegetative stage (V3) the plants were treated with the elicitors Acibenzolar-S-methyl and harpina, and distilled water (control). Seven days after the first application of the elicitors, the pathogen was inoculated on the leaves of bean plants. The severity assessment was performed every 10 days and the first evaluation 15 days after the pathogen inoculation. The measurement photosynthesis were performed 40 days after the inoculation when the symptoms and the damages of the disease showed themselves established. To carry out the biochemical analysis, samples of leaf tissue from each treatment were collected 24 hours before, 24, 48 and 72 hours after the application of the elicitors. Also, it was determined the yield and its components in both cultivars. The application of ASM and harpina provided the reduction in the severity of the common bacterial blight disease of the bean plants of IPR-Colibri cultivars and the same trend was observed for the IAPAR 31 cultivars treated with the elicitor ASM. Plants by IAPAR 31 treated with the elicitor ASM showed higher rates of assimilation of CO₂ when compared to the control and the same trend was observed for cultivar IPR-Colibri. The application of ASM promoted the increase of the antioxidative enzyme peroxidase activity, and the induction of the phenolic compounds synthesis and, especially in the susceptible cultivar IPR-Colibri. For grain yield and its components, significant differences were not observed between the control and the elicitors ASM and harpina. The elicitors ASM and harpina induced the resistance mechanisms in bean plant against *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, indicating the potentiality of the elicitor utilization in bean crops.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L.. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Inducers of resistance. Photosynthesis. Peroxidase. Superoxide dismutase. Total phenols. Total soluble proteins.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 – Condução do experimento na casa de vegetação (A) e sistema de irrigação (B). UTFPR – 2009 (Fonte: Capelin e Bressan, 2009).28

Fotografia 2 – Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijoeiro pelo método de inoculação foliar de agulhas múltiplas (A e B). UTFPR-2009 (Fonte: Capelin e Bressan, 2009).....30

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Alterações metabólicas em plantas provocadas por patógenos. Legenda: E=eliciador; R= receptor; CY= ciclo de Yang; SOD= superóxido dismutase; RET= receptor do etileno; PL= peroxidação de lipídios; CTR 1= proteína quinase ligada ao RET; AS= ácido salicílico; AJ= ácido jasmônico; RH= reação de hipersensibilidade; CAT= catalase; FAL= fenilalanina amônia-liase; PLO= polifenoloxidase. Beltrame (2010).21

Figura 02. Médias do rendimento de grãos das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. CV (%) = 35,77.36

Figura 03. Curva de progresso da severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* aos 15, 25, 35 e 45 dias após a inoculação – (DAI), em plantas de feijoeiro dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. Valores da escala de severidade adaptada de Pompeu e Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada. UTFPR, 2011.....37

Figura 04. Médias da fotossíntese das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011. Médias seguidas de letra minúsculas comparam todos os tratamentos entre si. Médias seguidas de letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem eliciadores dentro das cultivares. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%....41

Figura 05. Média dos tratamentos: água destilada, acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina no teor de compostos fenólicos 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos eliciadores em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Letras minúsculas comparam o mesmo horário entre as duas cultivares e letras maiúsculas comparam os diferentes horários em cada cultivar. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e CV (%) = 31,11.....42

Figura 06. Teor de compostos fenólicos 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% e CV (%) = 31,11.43

Figura 07. Teor de compostos fenólicos das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% e CV (%) = 11,84.44

Figura 08. Teor de compostos fenólicos das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.45

Figura 09. Concentração de proteínas totais 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% e CV (%) = 20,98....46

Figura 10. Concentração de proteínas totais das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.47

Figura 11. Atividade da enzima peroxidase 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de F ao nível de 5% e CV (%) = 54,71.48

Figura 12. Atividade da enzima peroxidase das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.49

Figura 13. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% e CV (%) = 46,71.51

Figura 14. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011.27
- Tabela 02.** Médias dos componentes do rendimento das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. MV = Massa de vagem, MG = Massa de grãos; NV = Número de vagens; NG = Número de grãos. UTFPR, 2010.35
- Tabela 03.** Médias de valores de severidade (15, 25, 35 e 45 dias após a inoculação – DAI) em plantas de feijoeiro dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Valores da escala de severidade adaptada de Pompeu e Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada. UTFPR, 2011.....37
- Tabela 04.** Médias dos valores da severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* aos 15, 25, 35 e 45 dias após a inoculação – DAI, em plantas tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. Valores da escala de severidade adaptada de Pompeu & Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada. UTFPR, 2011.....38
- Tabela 05.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, nas cultivares de feijão IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratados com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. UTFPR, 2011.....39
- Tabela 06.** Médias dos valores de assimilação de CO₂ (fotossíntese) em plantas de feijoeiro dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri, 40 dias após a inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. UTFPR, 2011.40

LISTA DE ABREVIATURAS

AACPD	Área abaixo da curva de progresso da doença
AJ	Ácido Jasmônico
AS	Ácido Salicílico
ASM	Acibenzolar-S-metílico
BDA	Batata-Dextrose-Agar
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
ET	Etileno
PAL	Fenilalanina amônia-liase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IR	Indução de Resistência
IRGA	Infra-Red Gas Analyzer
POX	Peroxidases
PRP's	Proteínas Relacionadas a Patogênese
RI	Resistência Induzida
RSA	Resistência Sistêmica Adquirida
RSI	Resistência Sistêmica Induzida
SOD	Superóxido Dismutase
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Fotossíntese	30
3.2 Severidade	31
3.3 Análises Bioquímicas	32
3.3.1 Teor de fenóis totais	32
3.3.2 Proteínas totais	33
3.3.3 Atividade específica da enzima peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)	33
3.3.4 Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD; E.C 1.15.1.1) ...	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5 CONCLUSÕES	53
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
ÍNDICE DE APÊNDICES	63
APÊNDICE A – Croqui do experimento	64

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura vastamente distribuída no Brasil, considerado o maior produtor e consumidor mundial do legume. Apesar disso, a produtividade média é muito inferior ao potencial da cultura. A baixa produtividade está relacionada aos problemas fitossanitários, a falta de controle e adubação adequada à cultura, além das condições climáticas nem sempre favoráveis. Pouco investimento é feito nesta cultura, pois a maioria dos produtores são pequenos agricultores, que não possuem poder aquisitivo para tal.

No entanto, a busca pela alta produtividade fez com que os agricultores passassem a utilizar produtos químicos de grande impacto ambiental, devido ao fácil uso e eficiência dos mesmos. Em função disso, medidas alternativas ao controle químico de doenças em plantas, como a adoção por tecnologias economicamente viável, são necessárias visando cumprir a alta produtividade e a redução do impacto ambiental.

O crestamento bacteriano comum (CBC), causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, é uma das principais doenças do feijoeiro. Seu controle é dificultado, pois não existe nenhum produto químico de eficiência comprovada para o CBC, tanto para tratamentos de sementes, quanto para plantas (CENTRO..., 2011).

Com o processo evolutivo, adaptações importantes ocorreram nas plantas para que estas pudessem sobreviver ao ambiente inóspito. As plantas passaram a desenvolver mecanismos de defesa como forma de proteção contra agentes patogênicos. Várias substâncias são produzidas ou induzidas pelas plantas antes ou após a infecção do patógeno. Essas substâncias podem ser tóxicas ao patógenos, que contribui para a resistência da planta (PASCHOLATI;LEITE, 1995). No final do século passado, as pesquisas com o uso da indução de resistência em plantas se intensificaram, e comprovaram a sua eficiência na redução da intensidade de várias doenças em plantas (KUHN; PASCHOLATI, 2010).

A indução de resistência em plantas envolve a ativação de mecanismos de defesa em resposta ao tratamento com agentes eliciadores, os quais são moléculas capazes de proteger as plantas contra infecções causadas por patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Entre os agentes eliciadores, os quais podem ser de origem biótica

ou abiótica, destacam-se a proteína harpina e o acibenzolar-S-metílico (ASM), respectivamente. Esses dois compostos se mostram eficientes no controle de doenças em plantas por induzir respostas que levam à expressão de resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI). No entanto, estes processos estão associados à capacidade do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno e/ou indutor e desencadear uma cascata de sinais bioquímicos que resultam na resistência das plantas aos patógenos (GUZZO; HARAKAVA, 2007).

Visto que, as plantas apresentam um sistema de defesa latente, é necessário descobrir novas tecnologias específicas para ativar os próprios mecanismos de defesa das plantas. Apesar de diversos estudos desenvolvidos com estes e outros possíveis indutores de defesa em plantas, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na ativação dessas respostas e eventos bioquímicos/fisiológicos associados.

Dessa forma, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar a eficiência dos eliciadores harpina e acibenzolar-S-metílico na indução de mecanismos de defesa em plantas de feijoeiro *P. vulgaris* L. e que resultem no desenvolvimento de resistência ao crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, avaliando-se possíveis alterações no processo de trocas gasosas e ativação das principais enzimas envolvidas na defesa vegetal - peroxidase, superóxido dismutase, além de proteínas e fenóis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O feijoeiro destaca-se no Brasil como um dos produtos agrícolas de grande importância econômica e social, por ser uma das principais fontes de proteína e de energia de origem vegetal (PEREIRA et al., 2004). Constitui a proteína vegetal mais significativa da alimentação do povo brasileiro, sobretudo nas classes de renda mais baixa (VIEIRA, 1998; RODRIGUES et al., 1999).

O consumo por pessoa estimado no Brasil é de 16 kg ano⁻¹ (CENTRO..., 2011). No ano agrícola 2010/2011, a produção prevista será de 1,54 milhões de toneladas, com os maiores aumentos em volume previstos para o Paraná, Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e Maranhão, que podem resultar numa produtividade média do feijão primeira safra de 1.104 kg ha⁻¹, com aumento de 6,5% em relação à safra passada que foi de 1.037 kg ha⁻¹ (COMPANHIA..., 2011). No entanto, alguns fatores como problemas fitossanitários, além de condições climáticas desfavoráveis (BORÉM; CARNEIRO, 2006) são responsáveis por grande perda da produção, os quais acabam afastando os grandes agricultores de se dedicarem a essa cultura, que permanece predominantemente com pequenos produtores (CENTRO..., 2011).

O CBC causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* que se manifesta por toda a parte área da planta (DOENÇAS..., 1994), é uma das principais doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro no Brasil (SILVA, 2008), principalmente em regiões com condições de alta temperatura e umidade. No Brasil, esta doença ocorre em todos os estados da Região Sul, com maior importância no Paraná e regiões Sudeste e Centro-Oeste, especialmente no plantio das águas (BIANCHINI et al., 2005; TORRES et al., 2009; CENTRO..., 2011). A bactéria é disseminada por meio de sementes, podendo permanecer viva por até 15 anos (BIANCHINI et al., 2005) e ataca toda a parte aérea da planta, com os sintomas da doença visualizados em folhas, caules, vagens e sementes (DOENÇAS..., 1994).

Os sintomas do CBC provocam a redução da área foliar fotossintetizante, devido à formação de manchas úmidas na face inferior que, posteriormente, originam extensas áreas necrosadas (ITO, 2009). À medida que as necroses se

desenvolvem, os tecidos tornam-se secos e quebradiços, circundados por um halo amarelo, facilmente observado na face superior das folhas (DOENÇAS..., 1994). Sob condições de alta umidade, o patógeno pode produzir, nas lesões, um exsudato de cor amarelada. Nas vagens, aparecem manchas encharcadas que posteriormente se tornam avermelhadas e se estendem ao longo do sistema vascular, indicando a progressão da bactéria para as sementes. Nos restos culturais, a sua sobrevivência é variável, podendo permanecer na superfície e sobreviver por até 180 dias (BIANCHINI et al., 2005; RAVA, 2009).

O principal modo de disseminação da bactéria é através de sementes contaminadas, respingos de chuva, implementos agrícolas e insetos. As sementes infectadas podem desenvolver lesões que circundam o nó cotiledonar, provocando o seu enfraquecimento e a quebra do caule, que não suporta o peso das vagens (DOENÇAS..., 1994).

Geralmente, são adotadas medidas preventivas para o controle do CBC, como o uso de sementes saudáveis, o uso adequado de irrigação, o cultivo em áreas não infestadas pelo patógeno e a rotação de culturas (MARINGONI; LAURETTI, 1999), já que não existem produtos químicos de eficiência comprovada no controle da doença (LOPES et al., 2008; CENTRO..., 2011).

As plantas, quando expostas às condições do ambiente, são capazes de formar barreiras preexistentes antes de ataques de agentes potencialmente danosos, como forma de evitar ou reduzir danos e garantir a sobrevivência e descendência. Essas barreiras são denominadas de defesas constitutivas, representadas por estruturas como ceras, cutículas, parede celular espessa, tricomas e fibras vasculares, além de substâncias químicas pré-formadas, como fenóis, alcalóides, fitotoxinas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Contudo, há mecanismos de defesa nas plantas que são produzidos ou ativados na presença do patógeno ou partes deste ou, ainda, de moléculas que simulem esta presença. Estes mecanismos resultam na formação de halos, lignificação, formação de papilas, tiloses, camada de cortiça, além de síntese de compostos fenólicos como as fitoalexinas além de espécie reativa de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (PASCHOLATI; LEITE, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004; SILVA, 2008).

Muitas plantas manifestam uma situação fisiológica que é denominada de estado de pré-condicionamento ou "Primmg" (CONRATH; GOELLNER, 2008) contra

uma série de doenças causadas por patógenos (PASCHOLATI et al., 2010). Como consequência, as plantas pré-condicionadas respondem mais rapidamente e/ou efetivamente quando expostas ao estresse biótico ou abiótico, uma característica que é frequentemente associada com resistência maior a doenças.

O pré-condicionamento é conhecido como um componente de resistência induzida (RI) (CONRATH; GOELLNER, 2008) e esta, por sua vez, é caracterizada por aumentar a atividade de determinadas rotas metabólicas específicas (MACAGNAN, 2007). O maior avanço na compreensão do fenômeno ocorreu recentemente (CONRATH; GOELLNER, 2008), sendo que este não é explicado pelo aumento dos mecanismos de defesa, mas pela maior sensibilidade da planta em perceber a chegada de um patógeno (KUHN; PASCHOLATI, 2007).

O fenômeno de indução de resistência (IR) a patógenos é conhecido há mais de 50 anos, e nos últimos 20 anos, a IR começou a ser investigada de forma mais direcionada aos aspectos moleculares e bioquímicos (PASCHOLATI et al., 2010), em busca de tecnologias que visam o aumento da produtividade das culturas pelo controle de doenças (ROMEIRO, 1999). A resposta da indução de resistência envolve a transdução de sinais de genes relacionados à defesa e de enzimas pré-formadas que promovem modificações específicas no metabolismo primário e secundário (CORDEIRO; SÁ, 1999).

A expressão indução de resistência pode ser utilizada para designar uma proteção local, assim como pode indicar uma resistência sistêmica que se manifesta distante do local onde foi aplicado o agente indutor (MORAES, 1992). As duas formas de IR melhores definidas são a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e Resistência Sistêmica Induzida (RSI), nas quais a origem do eliciador e o sítio de atuação deste na planta são importantes para a classificação da resistência e das respostas bioquímicas estimuladas (PASCHOLATI et al., 2010).

A RSA envolve a expressão de genes como das Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRPs), entre elas, β -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases, onde a indução é dependente do ácido salicílico (AS). A RSA pode ser ativada quando a planta é exposta aos patógenos virulentos, avirulentos, não-patogênicos ou quando tratadas com ácido 2,6 dicloro-isonicotínico (INA) ou ácido-benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbotiótico (BTH) (STICHER et al., 1997). A RSA só será estabelecida após um determinado período de tempo, sendo este necessário para que ocorra a expressão de genes, acúmulo de PRPs e a indução sistêmica do AS (PASCHOLATI et al.,

2010). Por outro lado, a RSI está associada ao ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (PIETERSE et al., 1998; PASCHOLATI et al., 2010), não envolvendo a síntese de PRPs (PASCHOLATI et al., 2010). Contudo, a resistência em plantas está associada à eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno através de mecanismos de percepção e transdução de sinais que podem resultar na resistência das plantas aos patógenos (GUZZO; HARAKAVA, 2007). Quando uma planta é desafiada por um patógeno ou tratada com eliciadores, ocorre alterações metabólicas nas plantas e também uma sinergia entre o metabolismo primário e secundário (VIECELLI, 2008) (Figura 01).

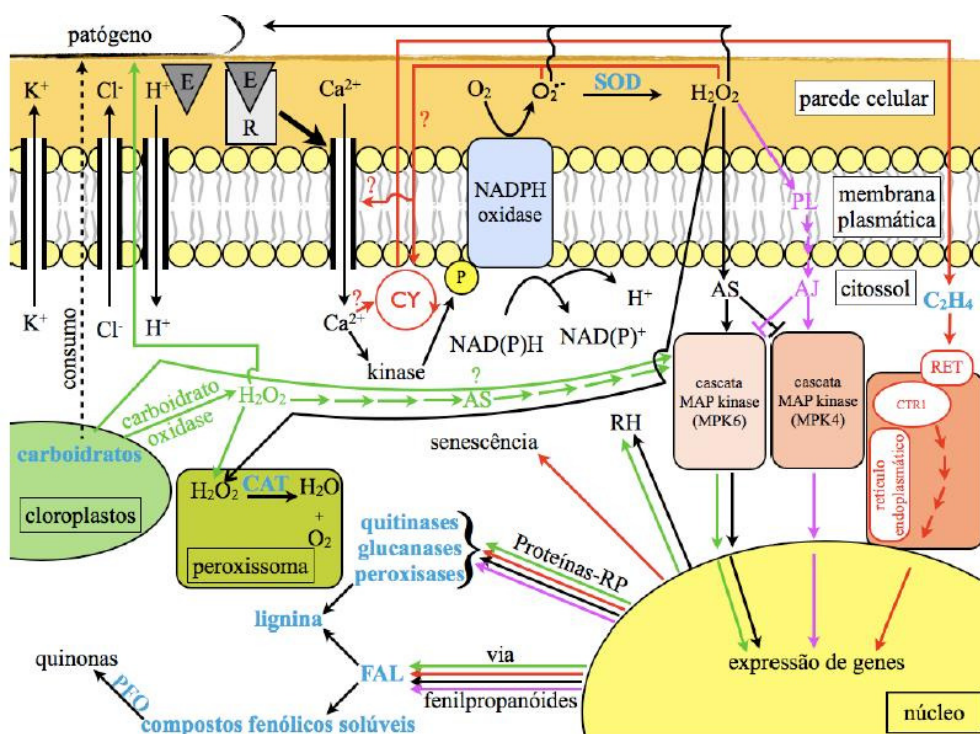


Figura 01. Alterações metabólicas em plantas provocadas por patógenos. Legenda: E=eliciador; R= receptor; CY= ciclo de Yang; SOD= superóxido dismutase; RET= receptor do etileno; PL= peroxidação de lipídios; CTR 1= proteína quinase ligada ao RET; AS= ácido salicílico; AJ= ácido jasmônico; RH= reação de hipersensibilidade; CAT= catalase; FAL= fenilalanina amônia-liase; PLO= polifenoloxidase. Beltrame (2010).

Para que os mecanismos de defesa sejam induzidos é necessário que a planta reconheça o patógeno. Este reconhecimento se dá pela ligação do eliciador

produzido pelo patógeno ou pela planta a um receptor presente na membrana plasmática da parede celular do vegetal (LABANCA, 2002) (Figura 01).

Esses mecanismos de reconhecimento do patógeno são considerados eventos primários e essenciais para a indução dos mecanismos de resistência (SILVA, 2008).

As plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes produzidos durante o metabolismo ou induzidos quando as plantas são submetidas a condições ambientais adversas. Os agentes oxidantes são resultantes de uma redução parcial do oxigênio molecular (MITTLER, 2002) e são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO's), podendo ser na forma de oxigênio singlete 1O_2 , radical hidroxila OH^\bullet , ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$ e peróxido de hidrogênio H_2O_2 (MITTLER, 2002; RESENDE et al., 2003; SCANDALIOS, 2005).

As ERO's são capazes de provocarem danos celulares, quebra na cadeia do DNA e oxidação de proteínas (ARGUIRRE et al., 2005). Porém, atuam de várias maneiras durante a resposta de defesa nas plantas, podendo induzir a expressão de genes de defesa (SOARES; MACHADO, 2007) agem diretamente sobre o patógeno e no fortalecimento da parede celular das plantas (RESENDE et al., 2003), além de estarem envolvidas direta ou indiretamente nas vias de sinalização do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (OVERMYER et al., 2003) (Figura 01).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ter ação tóxica direta sobre o patógeno e está envolvido no fortalecimento celular, sendo necessário para a biossíntese de lignina. Atua, também, como precursor secundário na ativação da hidrolase do ácido benzóico, enzima responsável pela conversão do ácido benzóico em ácido salicílico (RESENDE et al., 2003). Além de serem consideradas moléculas tóxicas (MITTLER, 2002), as ERO's podem agir como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa (SOARES; MACHADO, 2007). No entanto, quando a superprodução de ERO's causa um estresse oxidativo, mecanismos antioxidantes são ativados, como por exemplo, a síntese de enzimas antioxidativas, dentre elas a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), a ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), a catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6), peroxidase (POX E.C 1.11.1.7) (MITTLER, 2002; FELIPE et al., 2009).

A SOD é uma enzima que catalisa a formação do peróxido de hidrogênio através da dismutação de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 , desempenhando um papel importante no sistema de defesa antioxidante (SCANDALIOS, 2005; CATANEO et al., 2005),

podendo apresentar isoformas que variam de acordo com seus cofatores, como o Mn-SOD, Fe-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes compartimentos celulares (SCANDALIOS, 2005). Em trabalhos realizados com *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel, planta de sombra (MARCHESE et al., 2008) observaram que em condições de pleno sol, houve a produção das ERO's e em resposta ocorreu a ativação da SOD, através de suas isoenzimas Cu / Zn SOD, Fe-SOD, e MnSOD.

As POX são enzimas capazes de catalisar a transferência do hidrogênio de um doador para H₂O₂ constituindo numa proteção antioxidativa (LIMA et al., 1997; SBALCHEIRO et al., 2009). Essas enzimas estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas e em diversas reações celulares como a oxidação de compostos fenólicos, ligações de polissacarídeos e lignificação, funcionando como uma barreira física à penetração do patógeno (SBALCHEIRO et al., 2009). Broetto et al. (2005) observaram que as suspensões celulares de feijão tratados com a parede celular do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* pode induzir uma resposta celular. Esses autores apresentaram resultados eficazes na indução da atividade da Fenil alanina amônia-liase (PAL), relacionada com reações de defesa, bem como a POX, relacionada com o sistema de resposta antioxidativo.

A CAT tem a função de quebrar o peróxido de hidrogênio, resultando em água e oxigênio estável. Entre as enzimas degradantes de H₂O₂, é a única que não consome equivalentes redutores da célula e que possui um mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido formado em condição de estresse (SCANDALIOS, 2005).

A PAL (E.C 4.3.1.5), primeira enzima do metabolismo de fenilpropanóides, tem sido a enzima mais estudada por estar situada em um ponto intermediário entre o metabolismo primário e secundário, catalisando a primeira etapa dessa via (KUHN, 2007; EMILIANI et al., 2009). A PAL age sobre a fenilalanina removendo o grupamento amônia e convertendo-a para ácido *trans*-cinâmico, formando diversos compostos fenólicos que estão envolvidos na defesa (EMILIANI et al., 2009). Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com AS e um isolado de *Colletotrichum lindemuthianun* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade da FAL, porém a magnitude desta atividade variou em função da cultivar.

Neste contexto, entre as medidas alternativas ao controle químico de doenças o uso de agentes indutores de resistência, vem se destacando bem como a

compreensão dos fenômenos que ocorrem durante o processo desta indução (ROMEIRO, 1999; HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

Diversos compostos químicos vêm sendo utilizados e testados como indutores de resistência no controle de doenças em plantas. O BTH, também conhecido como Acibenzolar-S-metílico (ASM), composto sintético, é o mais bem estudado eliciador químico, por aumentar a atividade de enzimas envolvidas na resistência das plantas (MACAGNAN, 2007) e por não apresentar propriedades antimicrobianas, ativando os genes da RSA e das PRPs mediados pelo AS (OOSTENDORP et al., 2001; CIA et al., 2007). Este composto atua de forma similar ao AS na sinalização endógena na RSA (OOSTENDORP et al., 2001; IRITI et al., 2007; PASCHOLATI et al., 2010). Em se tratando de indutores abióticos, o ASM, age de forma sistêmica na indução de resistência, não apresentando qualquer efeito direto sobre os organismos alvo, podendo ser aplicado via solo ou pulverizações foliares. No Brasil, este produto está registrado para as culturas de algodão, batata, cacau (mudas), citros (mudas), feijão, melão e tomate (MINISTÉRIO..., 2008).

Vários trabalhos têm demonstrado a utilização eficiente de produtos comerciais em plantas cultivadas, como por exemplo, o ASM, no controle de doenças economicamente importantes. Morris et al. (1998) avaliaram, após 40 dias, os níveis de doença em sementes de milho tratadas com ASM e plantadas em solo infestado com *Peronosclerospora sorghi* e verificaram que o ASM foi eficaz na redução da doença, com a ativação de mecanismos de defesas nas plantas.

Araújo (2005) estudou a ação do ASM na indução de resistência à murcha bacteriana do tomateiro causado por *Ralstonia solanacearum*. As plantas tratadas com ASM em pulverização desenvolveram menos sintomas da murcha ao longo de todo o período do experimento, resultando em atraso no desenvolvimento da doença e redução de sua severidade, quando comparados aos controles.

KUHN (2007) verificou uma redução do crestamento bacteriano a partir da indução de resistência em plantas de feijoeiro, com os indutores ASM e *Bacillus cereus*, sendo que o efeito do ASM foi superior ao *B. cereus*, reduzindo a doença em torno de 79,1%. Calvacanti e Resende (2004) obtiveram reduções de até 55,4% na severidade da murcha de *Verticillium* em plântulas de cacauzeiro e um acréscimo de 10,5% no peso fresco e de 35,7% na altura das plantas em comparação com aquelas somente inoculadas com o fungo, evidenciando a eficácia do ASM como indutor de resistência em plântulas de cacauzeiro suscetíveis ao patógeno.

Outro agente eliciador capaz de desencadear a expressão dos mecanismos de defesa nas plantas é a harpina, que induz a resistência e promove o crescimento da planta (ROMEIRO; GARCIA, 2007). As harpinas são proteínas de natureza bacteriana, isoladas, inicialmente, de *Erwinia amylovora* e produzidas por diversas bactérias de ação patogênica em plantas que desencadeiam ambas as defesas, RSA e RSI. Além de ser considerado um agente indutor, a harpina ativa rotas de sinalização que culminam por ativar genes de resistência múltipla (ROMEIRO; GARCIA, 2007) e induz a resistência por via de sinalização do AJ e ET, além da rota de sinalização por AS (DONG et al., 1999).

A primeira harpina foi isolada a partir de cultura de um cultivo avirulento *E. amylovora* (WEI et al., 1992) e vem demonstrando um grande potencial na ativação de resistência em diversos vegetais, sob diferentes aspectos e níveis de eficiência (TOMAZELLI, 2010). O Biopesticida Messenger® é um produto comercial desenvolvido a base de harpina, que ativa o mecanismo de defesas naturais da planta e promove o crescimento vegetal. O Messenger® tem demonstrado ação indutora em mais de 40 culturas e mostrou-se efetivo para o algodão, trigo, pepino, citrus, fumo, morango, tomate e pimentão (ROMEIRO; GARCIA, 2007).

Outro produto, ProAct™, também à base de harpina, contém na sua formulação uma seqüência de quatro fragmentos desta proteína harpinN, harpinW, popA e harpinZ, isolados de três bactéria *E. amylovora*, *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae*; Os fragmentos harpinN, harpinW são produzidos através da inclusão de fragmentos de DNA dessas três bactérias em *Escherichia coli*, que apresenta baixa toxicidade e impacto no ambiente rural. Em testes realizados pela agência americana de proteção ambiental, a proteína harpina não apresentou nenhum sintoma de toxicidade ou hipersensibilidade (U.S. ENVIRONMENTAL..., 2005). Danner et al. (2008), em trabalho realizado com pêssegos tratados com proteína harpina ProAct™, verificaram redução na área lesionada por *Monilinia fructicola* em 31,5% com aumento da atividade da PAL, além de acúmulo de compostos fenólicos nos tecidos vegetais.

Os eliciadores ASM e a proteína harpina, se mostram eficientes no controle de doenças em plantas por induzir respostas que levam à expressão da RSA e RSI. No entanto, estes processos estão associados à capacidade do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno e/ou indutor e desencadear uma cascata de sinais bioquímicos que resultam na resistência das plantas aos patógenos (GUZZO;

HARAKAVA, 2007). Mais estudos científicos com indutores de resistência são necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação de respostas de defesa, bem como os eventos fisiológicos decorrentes dessas nas plantas

Devido à baixa toxicidade e possível ação indutora, os eliciadores ASM e a proteína harpina foram escolhidos no presente trabalho, com o objetivo de verificar o efeito destes na indução de resistência a doença do crestamento bacteriano comum, bem como, avaliar a indução da produção de proteínas totais, enzimas antioxidativas como as peroxidases e superóxido dismutase, e produção de compostos fenólicos nas plantas de feijoeiro desafiadas com a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), localizada na cidade de Pato Branco-PR, em latitude 26°07' S, longitude 52°41' O, altitude de 760 m, no período do mês de maio a setembro de 2009. O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso com três repetições, sendo cada repetição constituído por seis parcelas com 17 vasos cada contendo três plantas por vaso (Apêndice A) com espaçamento de 15 cm entre os vasos. Para avaliação dos componentes de rendimento o experimento foi conduzido em esquema bifatorial (2x3), cujos tratamentos foram duas cultivares de feijoeiro: IAPAR 31 moderadamente resistente, (INSTITUTO...,2011a) e IPR-Colibri suscetível ao crestamento bacteriano comum (INSTITUTO...,2011b). Ambas as cultivares foram fornecidas pelo Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, Londrina PR.

As cultivares foram semeadas em vasos de 5 L contendo Latossolo vermelho distroférrico corrigido seguindo a análise química do solo (Tabela 1) segundo as recomendações para a cultura do feijão do Manual de adubação e calagem (SOCIEDADE..., 2004). A calagem foi realizada utilizando-se uma dose de CaCO_3 de 2,38 Mg ha^{-1} ou 5,95 g por vaso, dosagem equivalente para a elevação da saturação por bases para 70%. Para adubação de base utilizou-se adubação NPK = 38-95-95 kg ha^{-1} utilizando-se uma dosagem de 1,18 g vaso^{-1} da formulação comercial NPK = 8-20-20. As sementes não foram submetidas ao tratamento fitossanitário.

Tabela 01. Características químicas do solo antes da implantação do experimento. UTFPR, 2011.

pH - CaCl_2	Índice SMP	MO	P	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Al^{3+}	$\text{H}^+ + \text{Al}^{3+}$	CTC	V	m
		g dm^{-3}	mg dm^{-3}			$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$				%	
4,80	5,60	42,89	4,13	0,73	4,44	2,50	0,05	6,69	14,36	53,41	0,65

MO = material orgânica; V = saturação por bases; m = saturação por alumínio.

Foram semeadas cinco sementes por vaso a uma profundidade de 2 cm, e posteriormente, realizado o raleio deixando-se três plantas por vaso em condições de casa de vegetação, sob temperatura entre 16 e 28 °C com UR média 85%. As plantas foram irrigadas diariamente por 4 min, através do sistema de aspersão (Fotografia 1).



Fotografia 1 – Condução do experimento na casa de vegetação (A) e sistema de irrigação (B). UTFPR – 2009 (Fonte: Capelin e Bressan, 2009).

A primeira aplicação dos eliciadores foi realizada aos 42 (DAP) dias após o plantio. Durante o preparo da calda de aplicação utilizou-se 0,250 g acibenzolar-S-metílico (ASM) (Bion®) e 0,375 g proteína harpina (ProAct™), cada produto foi diluído em dois litros de água destilada totalizando 25 g ha⁻¹ e 37,5 ha⁻¹ respectivamente para uma calda de aplicação de 200 L ha⁻¹. E para o tratamento controle foi utilizado apenas água destilada.

Ambas as cultivares foram tratadas com os eliciadores, aplicando-se 31,67 µg de ASM planta⁻¹, 47,51 µg da proteína harpina planta⁻¹ e água destilada como controle. Cada planta recebeu 0,25 mL de calda. Os eliciadores foram aplicados quinzenalmente de acordo com as recomendações do produto.

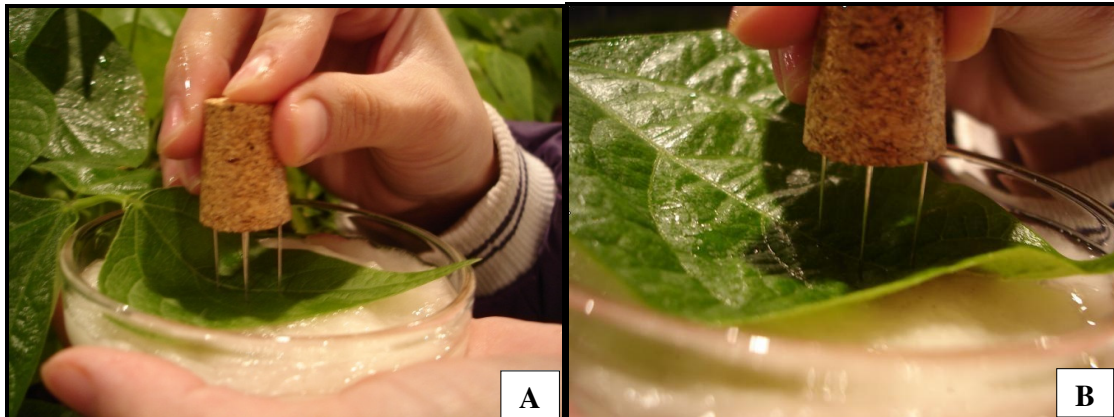
Para aplicação dos produtos nas plantas de feijoeiro utilizou-se pulverizador costal pressurizado (CO₂), equipado com uma barra de 3 bicos Teejet®, estando esses bicos espaçados em 0,50 m. A pressão de trabalho empregada foi de 10 lb

pol², resultando numa vazão de 10,6 mL por bico segundo⁻¹. Como cada unidade experimental era constituída por 17 vasos com três repetições e duas cultivares recebendo os produtos ASM, harpina ou água destilada, cada aplicação foi realizada sobre 102 vasos de 22 cm de diâmetro cada. Os vasos foram movidos para a parte externa da casa de vegetação sendo organizados em filas de 17 vasos de cada unidade experimental posicionados lado a lado totalizando em seis filas de 17 vasos cada, sendo uma faixa de aplicação de 3,74 x 1,32 metros, restando 9 cm em cada lateral.

O tempo de aplicação foi estipulado considerando-se um volume de calda de aplicação de 200 L ha⁻¹, largura da barra de aplicação de 1,5 m e distância a percorrer sobre os vasos de 3,80 m totalizando uma área de aplicação de 5,70 m² com necessidade de calda de 114 mL. Como a vazão de cada bico é igual a 10,6 mL segundo⁻¹ e a barra de aplicação possui três bicos, a aplicação foi executada em um tempo aproximado de 3,58 segundos.

O isolado CNPAF Xap 19 da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi obtido de feijoeiro BRS Uirapuru, cultivado no Estado do Paraná, fornecido pela EMBRAPA Arroz e Feijão-GO. Amostra do inóculo bacteriano contido no papel filtro, foram depositados no centro das placas de petri contendo meio BDA (batata-dextrose-água), mantidos em B.O.D. com fotoperíodo de 12 horas, a 25 °C, por 72 horas. As colônias bacterianas foram retiradas com pincel úmido e diluído em 100 mL de água destilada e esterilizada.

A inoculação foi realizada aos 49 dias após o plantio (DAP), ao final da tarde, com irrigação prévia de 7 min para a inoculação do patógeno afim de garantir um microclima úmido para infecção e desenvolvimento da doença. Para inoculação da patógeno foram realizados ferimentos em dois folíolos do terço superior de cada planta do feijoeiro pelo método de inoculação foliar de agulhas múltiplas utilizando-se, cinco agulhas cravadas de forma equidistante numa rolha de 2 cm de diâmetro. Posteriormente, dois folíolos de cada planta de feijão, foram colocados sobre uma placa de petri contendo algodão esterilizado e umedecido com suspensão bacteriana na concentração de 5×10^{-7} ufc mL⁻¹ do isolado *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, pressionando-se o conjunto de agulhas sobre a folha, baseando-se na metodologia de Andrus (1948), utilizado por Maringoni (1998), Maringoni e Torres (1999) e descrito por Silva et al. (2009) (Fotografia 2). Todos os tratamentos foram inoculados com o patógeno.



Fotografia 2 – Inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijoeiro pelo método de inoculação foliar de agulhas múltiplas (A e B). UTFPR-2009 (Fonte: Capelin e Bressan, 2009).

Para avaliação do rendimento e seus componentes foram avaliados: Massa de vagens; número de vagens; massa de grãos e número de grãos, coletados no estágio de maturação fisiológica. O material coletado foi submetido à estufa de secagem a 62 °C até massa constante. Os dados foram submetidos à análise de variância no programa estatístico Assistat 7.6, e as médias comparadas por meio do Teste de Tukey em nível de 5%.

3.1 Fotossíntese

As avaliações de fotossíntese foram realizadas 40 dias após a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* quando os sintomas e danos da doença demonstravam-se estabelecidos. As leituras das trocas gasosas foram realizadas durante o período da manhã entre as 9:30 e 11:00 h, com a utilização de um sistema aberto de medição de trocas gasosas equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) modelo LI-6400XT (LI-COR, Lincoln, Nebraska – USA), com injetor automático de CO₂, e fonte artificial de luz vermelha e azul, em folhas inoculadas com o patógeno mais o controle. As condições microclimáticas na câmara foram

mantidas constantes durante as medições realizadas nos diferentes tratamentos, com temperatura de ± 25 °C, $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de PAR (photosynthetic active radiation), e 400 ppm de CO_2 . Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância no programa estatístico Assistat 7.6, e as médias comparadas por meio do teste de Tukey em nível de 5%.

3.2 Severidade

A avaliação da severidade foi realizada a cada 10 dias sendo a primeira avaliação realizada 15 dias após a inoculação do patógeno (DAI) em dezesseis folíolos por parcela. Os sintomas foliares foram avaliados atribuindo-se notas que variaram de um a cinco conforme a escala de severidade adaptadas de Pompeu & Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada com base nas avaliações de severidade através da equação citada por SHANER e FINNEY (1977).

$$AACPD = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]$$

Onde:

n – é o número de observações.

Y_i – é a severidade da doença na “i”-ésima observação;

T_i – é o tempo em dias na “i”-ésima observação;

Os resultados da AACPD foram submetidos à análise de variância (ANOVA) no programa estatístico Assistat 7.6, e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade.

3.3 Análises Bioquímicas

Para a realização das análises bioquímicas, o experimento foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa o experimento foi conduzido no esquema trifatorial (2x3x4) sendo os fatores duas cultivares de feijoeiro, aplicação de dois eliciadores mais água destilada e o terceiro fator considerado o tempo de coleta das amostras de tecidos foliares de cada tratamento: 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação dos eliciadores. Na segunda etapa, realizaram-se as coletas a 24 e 48 h após as plantas serem desafiadas pelo patógeno, constituindo um esquema trifatorial (2x3x2). Imediatamente após a coleta, as amostras de tecidos foliares foram acondicionadas em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, para interromper as atividades enzimáticas das plantas e armazenadas em Freezer a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.1 Teor de fenóis totais

Para o teor de fenóis totais foi utilizado a metodologia de Bialeski e Turner, (1966) e Jennings, (1991). Foram macerados 100 mg do material vegetal e adicionado 1 mL da solução MCA (Metanol: Clorofórmio: Água destilada). Após a maceração o material foi centrifugado por 20 min a $6.000 \times g$ em $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, foi coletado o sobrenadante total. Do resíduo sólido restante foi realizada nova extração, adicionando mais 1 mL de MCA, agitou-se no vórtex e centrifugou-se novamente a $6.000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. Coletou-se o sobrenadante e adicionou ao primeiro sobrenadante, obtendo o extrato MCA. A este extrato foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água. Em seguida centrifugou-se a $6.000 \times g$, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Foram retirados 0,5 mL da parte superior do sobrenadante e adicionado 5 mL de água + 0,5 mL do reagente de Folin – Ciocalteau diluído 1:10. Após 15 minutos, foram adicionado 5 mL do reagente

alcalino A (preparado de carbonato de sódio a 2% em solução de hidróxido de sódio 0,1 N). Após 50 min foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 760 nm. O resultado foi expresso em mg g de tecido vegetal fresco⁻¹. Utilizou-se uma curva padrão de tirosina de 0 a 100 mg.

3.3.2 Proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais nos tecidos vegetais foi utilizado o método de Bradford (1976). Foram macerados 100 mg de tecido em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 6.7. Após, foram centrifugados por 10 min a 5000 x *g* e em seguida retirado o sobrenadante (extrato bruto). Foram pipetadas três alíquotas de 40 µL de extrato + 660 µL de água destilada + 1 mL do reativo de Bradford. Após 15 min, foram realizadas as leituras utilizando-se espectrofotômetro a 595 nm. As leituras foram comparadas com o padrão BSA (Albumina de Soro Bovino) na concentração de 0 a 100 µL, através da equação da reta.

3.3.3 Atividade específica da enzima peroxidase (POX; EC 1.11.1.7)

Para atividade da enzima POX foi utilizada a metodologia de Peixoto et al. (1999), determinada através da diluição (1:25) de 100 µL de extrato bruto e adicionados a 4,9 mL de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de Pyrogallol e 20 mM H₂O₂. Após incubação por 1 min a reação foi paralisada com 0,5 mL de H₂SO₄. A leitura de absorbância foi feita a 420 nm. A atividade específica (µKat µg Prot⁻¹) da enzima foi calculada usando-se um coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹.

3.3.4 Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD; E.C 1.15.1.1)

A atividade da enzima SOD foi determinada utilizando a metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977) pela reação de 50 μL de extrato bruto com uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 μM de NBT (Nitro blue tetrazolium), 100 nM de EDTA e 2 μM de riboflavina em 1,0 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25 °C. Após 5 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz. O composto azul formado (formazana) pela fotoredução do NBT foi determinado pelo incremento na absorção a 560 nm. Os tubos considerados branco para a análise receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos com papel alumínio, abrigados da luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para a inibição de 50% da fotoredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considerou-se a percentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) utilizando-se as fórmulas:

$$\text{Fórmula: } \frac{\text{Controle} - \text{Amostra}}{\text{Controle}} \times 100 = \% \text{ Inibição}$$

$$\text{Atividade específica da SOD} = \frac{U}{\mu\text{g de proteína}} = \frac{\% \text{ de inibição} \times \text{volume da amostra } \mu\text{L}}{50 \% \times \text{concentração de proteína } \mu\text{g } \mu\text{L}}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento realizado em casa de vegetação, não foram verificadas diferenças significativas para o rendimento e seus componentes em ambas as cultivares testadas, tratadas com os eliciadores ASM e harpina (Tabela 02).

Independentemente de não haver resultado significativo, verificou-se uma tendência de maior rendimento de grãos nas plantas da cultivar IAPAR 31 tratadas com ambos eliciadores em detrimento do controle (água) (Figura 02). Essa tendência também foi verificada para os componentes de rendimento: número de vagens, massa de grãos e número de grãos, resultados que corroboram com os observados para rendimento (Tabela 02).

Tabela 02. Médias dos componentes do rendimento das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. MV = Massa de vagem, MG = Massa de grãos; NV = Número de vagens; NG = Número de grãos. UTFPR, 2010.

Tratamentos		Componentes do rendimento (g planta ⁻¹)			
Cultivares	Elicidores	MV ¹	NV	MG	NG
Iapar 31	Controle	0,86 a	4,56 a	2,93 a	15,81 a
	ASM	0,69 a	4,88 a	4,39 a	17,59 a
	Harpina	0,85 a	4,91 a	3,56 a	17,18 a
IPR - Colibri	Controle	0,78 a	4,80 a	3,40 a	16,36 a
	ASM	0,56 a	3,43 a	3,02 a	11,58 a
	Harpina	0,65 a	3,92 a	3,26 a	13,34 a
Médias		0,73 a	4,42 a	3,43 a	15,31 a
CV%		26,29	27,07	35,77	28,29

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível 5%. CV = Coeficiente de variação.

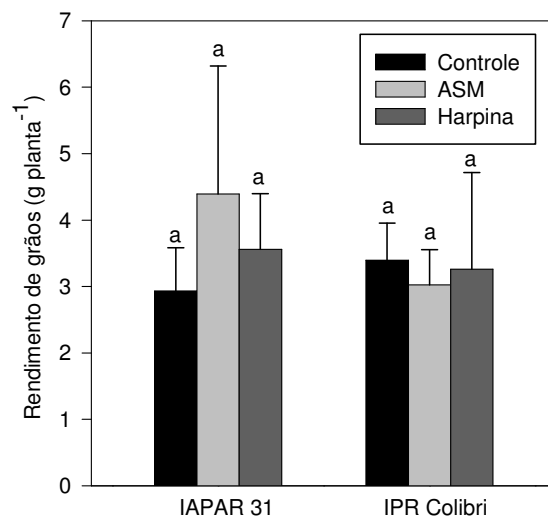


Figura 02. Médias do rendimento de grãos das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. CV (%) = 35,77.

Navarini et al. (2009) verificaram que o efeito da adição do ASM em programas de controle químico mostrou incremento significativo tanto no controle do CBC como no rendimento de grãos. Por outro lado, Kuhn (2007) observou uma tendência na redução da produtividade do feijoeiro, principalmente no número de vagens por planta e no número de grãos por vagens quando induzidos por ASM. Todavia, há que se considerar que os resultados encontrados por esse autor foi para plantas tratadas com ASM em comparação com plantas não tratadas, mas que não foram expostas por nenhum patógeno, evidenciando apenas o custo metabólico do pré-condicionamento da defesa.

Com relação à severidade (Tabela 03), na média das cultivares, houve diferença significativa entre os tratamentos controle e eliciadores, observando-se maior severidade no tratamento controle. Para a cultivar IPR Colibri, os eliciadores foram efetivos e reduziram significativamente a severidade do ataque de *X. axonopodis*. Para a cultivar IAPAR 31 considerada moderadamente resistente, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, todavia, houve tendência de redução da severidade nos tratamentos eliciados. Essa tendência de redução da severidade pode ter contribuído para o maior rendimento de grãos nas plantas da cultivar IAPAR 31 eliciadas (Tabela 02).

Tabela 03. Médias de valores de severidade (15, 25, 35 e 45 dias após a inoculação – DAI) em plantas de feijoeiro dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Valores da escala de severidade adaptada de Pompeu e Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada. UTFPR, 2011.

Cultivares	Severidade			Médias
	Controle (água)	ASM	Harpina	
IAPAR 31	2,083 bA	1,843 bA	2,062 bA	1,996 b
IPR Colibri	3,239 aA	2,562 aB	2,687 aB	2,829 a
Médias	2,661 A	2,203 B	2,375 B	
C.V. (%)				13,78

Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ao nível 5%.. CV= Coeficiente de variação.

Também foi avaliada a curva do progresso da doença (Figura 03), e verificou-se que ao final das avaliações de severidade, aos 45 dias após a inoculação (DAI) do patógeno, para ambas as cultivares, as plantas do tratamento controle apresentaram maior severidade da doença que às dos tratamentos eliciados.

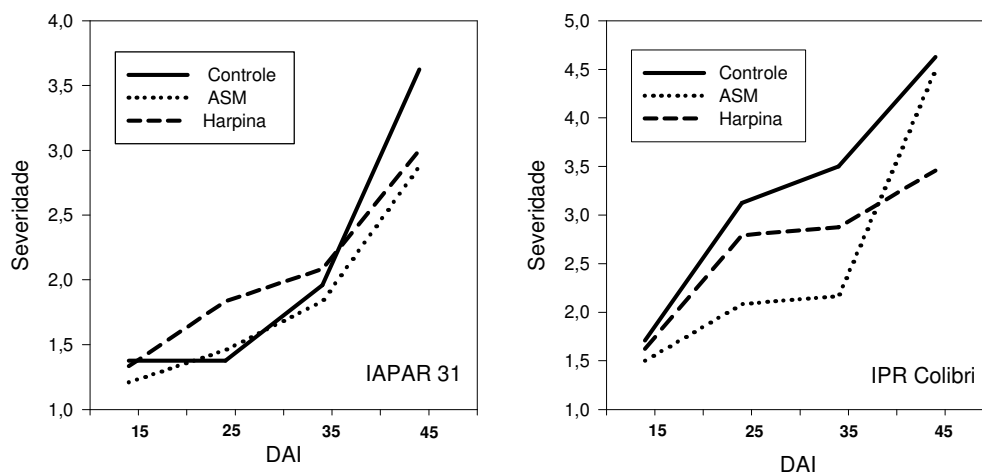


Figura 03. Curva de progresso da severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* aos 15, 25, 35 e 45 dias após a inoculação – (DAI), em plantas de feijoeiro dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e harpina. Valores da escala de severidade adaptada de Pompeu e Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada. UTFPR, 2011.

Na comparação dos eliciadores não houve diferenças na severidade entre os três tratamentos na primeira avaliação realizada aos 15 DAI. Aos 25 e 35 DAI o

eliciador ASM diferiu dos demais tratamentos com os menores valores de severidade. Entretanto, o eliciador harpina aos 45 DAI diferiu do controle apresentando os menores valores de severidade e o eliciador ASM não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 04).

Tabela 04. Médias dos valores da severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* aos 15, 25, 35 e 45 dias após a inoculação – DAI, em plantas tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. Valores da escala de severidade adaptada de Pompeu & Crowder (1972) e Schuster et al. (1983) por Maringoni (1998): (1) sem sintomas; (2) até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (3) entre 25 e 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada; (4) entre 50 e 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada; e (5) acima de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada. UTFPR, 2011.

Tratamentos	DAI			
	15 ¹	25	35	45
Controle	1,541 a	2,250 a	2,729 a	4,125 a
ASM	1,354 a	1,770 b	2,000 b	3,687 ab
Harpina	1,479 a	2,312 a	2,479 a	3,229 b
C.V. (%)	13,78			

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível 5%. CV= Coeficiente de variação.

A aplicação de ASM tem demonstrado resultados satisfatórios na indução de resistência a doenças na cultura do feijoeiro conforme relatos de Kuhn (2007) e Faulin (2010). Este último autor verificou uma redução de 80% no CBC em feijoeiro tratado com ASM, em relação às plantas não tratadas.

Faulin (2010) verificou que houve indução de resistência em plantas de feijão pré-tratadas com ASM e expostas com *X. axonopodis*, onde as mesmas apresentaram menor severidade da doença, quando expostas ao patógeno. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2006) trabalhando com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em feijão caupi induzida por ASM.

No trabalho realizado por Baysal et al. (2005) com plantas de pimenta observou-se uma redução dos sintomas causados por *Phytophthora capsici* que foi de 45% com aplicação de ASM, comparado a testemunha, aos sete dias após a inoculação do patógeno.

Em plantas de feijão com aplicação do ASM isoladamente e associado à fungicida, avaliando-se a severidade de antracnose e CBC, evidenciou-se redução

significativa nestas doenças em comparação com o controle (sem ASM). Quando o indutor foi associado com o fungicida, não foram verificadas diferenças significativas em relação ao seu emprego isolado (NAVARINE et al., 2009).

Em tratamentos com eliciadores na cultura do tomateiro, verificou-se que o eliciador harpina reduziu significativamente a severidade da bactéria *Xanthomonas campestris* em relação ao controle, sendo menos eficiente que o eliciador ASM. (OBRADOVIC et al., 2004). Neste caso, o momento de aplicação dos eliciadores nas fases iniciais da cultura, pode possibilitar um pré-condicionamento das plantas, antes que ocorra a infecção.

A análise da AACPD corrobora os resultados obtidos nas avaliações de severidade. Neste trabalho foi possível observar uma redução significativa da para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* com o uso dos eliciadores ASM e harpina para a cultivar IPR-Colibri em comparação ao controle (Tabela 05). Esses resultados estão de acordo com outros de diversos estudos que apontam o ASM e a proteína harpina como eficientes eliciadores (Tabela 05). Para a cultivar IAPAR 31 não houve diferença significativa entre as plantas tratadas e o controle.

Tabela 05. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) do crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, nas cultivares de feijão IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratados com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. UTFPR, 2011.

Cultivares	AACPD			Médias
	Controle (água)	ASM	Harpina	
IAPAR 31	58,333 bA	53,333 bA	60,833 bA	57,500 b
IPR Colibri	97,916 aA	72,500 aB	82,083 aB	84,166 a
Médias	78,12 A	62,91 B	71,45 AB	
C.V. (%)	8,70			

Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ao nível 5%. CV= Coeficiente de variação

Com relação à fotossíntese (Tabela 06), na média das cultivares, houve diferenças significativas entre os tratamentos controle e o eliciador ASM. Para a cultivar IAPAR 31, o tratamento com o eliciador ASM obteve o melhor resultado, diferindo do tratamento controle.

Tabela 06. Médias dos valores de assimilação de CO₂ (fotossíntese) em plantas de feijoeiro dos cultivares IAPAR 31 e IPR Colibri, 40 dias após a inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina. UTFPR, 2011.

Cultivares	Taxa de assimilação de CO ₂ (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)			Médias
	Controle (água)	ASM	Harpina	
IAPAR 31	5,171 aB	10,889 aA	8,042 aAB	8,034 a
IPR Colibri	5,984 aA	7,350 aA	7,280 aA	6,871 a
Médias	5,578 B	9,120 A	7,661 AB	
C.V. (%)	28,64			

Médias seguidas da mesma letra, minúsculas na coluna e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível 5%. CV= Coeficiente de variação.

A menor severidade da doença, embora não significativa, foi observada no cultivar IAPAR 31 com aplicação do eliciador ASM (Tabela 03). Independentemente de não haver resultado significativo para severidade, verificou-se que para o mesmo eliciador, aplicado na mesma cultivar, as plantas apresentaram os maiores valores de assimilação de CO₂ diferindo das plantas controle (Tabela 06).

Analisando a comparação entre as médias dos tratamentos, o eliciador ASM diferiu do tratamento controle apresentando a maior taxa de assimilação de CO₂ (Tabela 06). A mesma resposta foi observada para severidade na comparação entre as médias dos tratamentos (Tabela 03).

Segundo Pascholati e Leite (1995), um aumento da atividade fotossintética ocorre no início do processo da doença, por um período reduzido, seguido, invariavelmente, pela redução da taxa de fotossíntese, por causa do aumento do surgimento de áreas cloróticas a necrosadas. Os maiores resultados de fotossíntese obtidos para a cultivar IAPAR 31 tratada com ASM estão associados com a maior preservação dos tecidos fotossinteticamente ativos, o que resulta em uma maior taxa de assimilação de CO₂ (Figura 04).

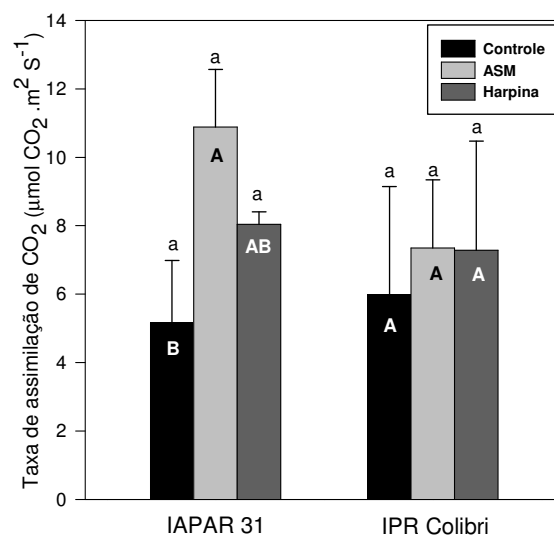


Figura 04. Médias da fotossíntese das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011. Médias seguidas de letra minúsculas comparam todos os tratamentos entre si. Médias seguidas de letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem eliciadores dentro das cultivares. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

A maior fotossíntese está associada à tendência do incremento do rendimento e seus componentes neste trabalho (Tabela 02). Para a cultivar IPR Colibri não foi observado diferença significativa entre os tratamentos, embora exista uma tendência de maior assimilação de CO₂ nos tratamentos eliciados.

Para o teor de compostos fenólicos, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos com os eliciadores ASM e harpina, em relação ao controle. Entretanto, houve um aumento significativo de fenóis para todos os tratamentos nas avaliações realizadas com o passar do tempo 24 , 48 e 72 horas após a primeira aplicação dos eliciadores quando comparados com avaliação realizada 24 horas antes da aplicação. Houve aumento significativo no teor de compostos fenólicos 72 horas após a aplicação dos eliciadores em ambas as cultivares quando comparados com 24 horas antes da aplicação dos eliciadores (Figura 05).

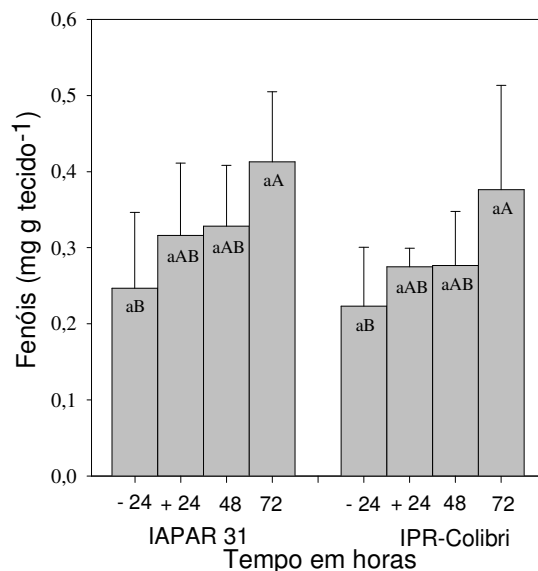


Figura 05. Média dos tratamentos: água destilada, acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina no teor de compostos fenólicos 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da primeira aplicação dos eliciadores em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Letras minúsculas comparam o mesmo horário entre as duas cultivares e letras maiúsculas comparam os diferentes horários em cada cultivar. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% e CV (%) = 31,11.

Todavia, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos eliciados, verificou-se uma tendência de aumento no teor de fenóis em plantas tratadas com os eliciadores, em relação ao controle para a cultivar IPR-Colibri, setenta e duas horas após a primeira aplicação dos eliciadores (Figura 06). Este fato deve-se, provavelmente, pela formação dos fenóis ser dependente da expressão da enzima PAL, chave do metabolismo de fenilpropanóides, que agem na defesa das plantas. Segundo Broetto e Crocomo (1995), esta enzima é regulada pelas taxas de transcrição de RNAm que diferem no modo de indução de outras enzimas como a CoA-ligase, apresentando uma fase de latência, após o início da exposição luminosa quando submetidos a irradiação com luz UV. Este período de latência pode ser responsável pelo aumento no teor de fenóis totais 72 horas após a primeira aplicação dos eliciadores, podendo ser este período de latência necessário para que ocorra a expressão de genes da PAL.

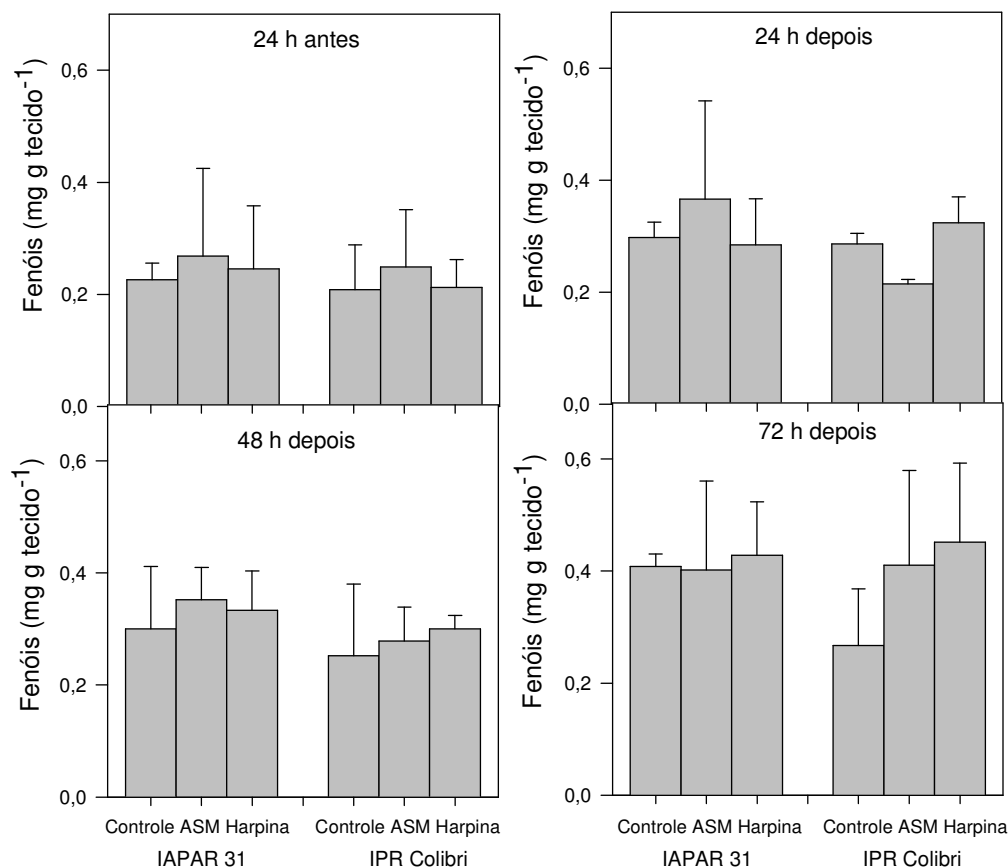


Figura 06. Teor de compostos fenólicos 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% e CV (%) = 31,11.

Após as plantas serem expostas ao patógeno (24 e 48 horas após a inoculação) verificou-se que os eliciadores ASM e Harpina apresentaram diferença significativamente superior no teor de fenóis em relação ao controle para ambas as cultivares (Figura 07).

Entretanto, quando desdobrada a interação das cultivares com os eliciadores, mesmo que não significativa, observa-se uma tendência no aumento do teor de fenóis 24 e 48 horas após a inoculação para a cultivar IPR-Colibri, quando tratada com os eliciadores ASM e harpina em relação ao controle (Figura 08). Esta tendência foi menos expressiva para a cultivar IAPAR 31, considerada moderadamente resistente ao CBC (INSTITUTO...,2011a).

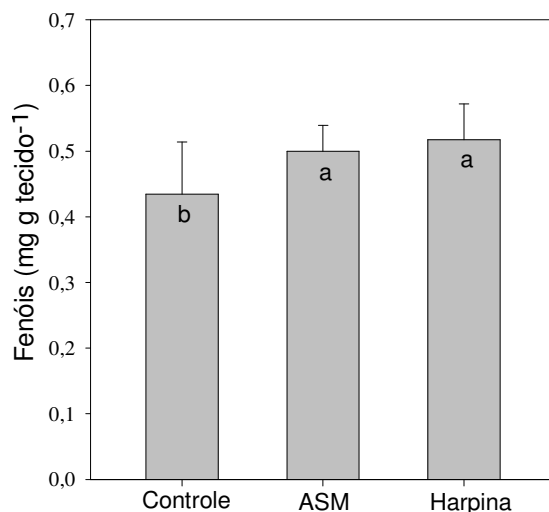


Figura 07. Teor de compostos fenólicos das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, e expostas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% e CV (%) = 11,84.

Segundo Bennett e Wallsgrave (1994) há vários exemplos de cultivares resistentes acumularem concentrações de fitoalexinas, em comparação com cultivares suscetíveis. Barros et al. (2010) relatam que as cultivares resistentes produzem rapidamente compostos fenólicos que se acumulam após a infecção do patógeno, sendo estes compostos que se mostram tóxicos ao patógeno. Este relato corrobora os resultados encontrados neste trabalho, onde se observou que o teor de fenóis para a cultivar IAPAR 31 apresenta-se muito semelhante entre as plantas tratadas e o controle, indicando que esta cultivar apresenta respostas de defesa ativadas na presença do patógeno mesmo quando não eliciadas. Portanto, a aplicação dos eliciadores apresenta-se aparentemente mais eficiente quando aplicada em cultivares suscetíveis como é o caso da cultivar IPR-Colibri.

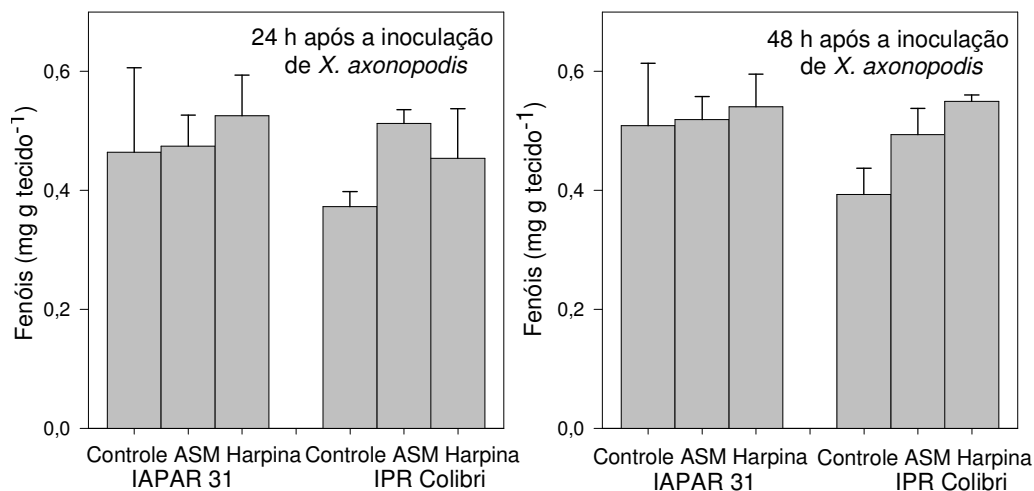


Figura 08. Teor de compostos fenólicos das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR-Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.

Estes resultados sugerem que os compostos fenólicos induzidos pelos eliciadores participaram ativamente na proteção das plantas contra *X. axonopodis*. Resultados estes que são corroborados pelos observados por Campos et al. (2004) que verificaram acúmulo de compostos fenólicos nas plantas de feijoeiro tratadas com ácido salicílico (análogo do ASM), cinco dias após a inoculação do patótipo virulento de *Colletotrichum lindemuthianum*, apresentando diferenças significativas em todos os tratamentos e cultivares testadas. Baysal et al. (2005) também verificaram um aumento significativo de compostos fenólicos em plantas de pimenta tratadas com ASM, inoculadas e não inoculadas com *Phytophthora capsici* em comparação a testemunha com e sem a inoculação do patógeno, observando aumentos de compostos fenólicos nas plantas inoculadas.

Contudo, o acúmulo destes compostos nas plantas é essencial para a sua defesa, podendo ser tóxicos aos patógenos, além de agirem como antioxidantes.

Para a concentração de proteínas totais, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos com os eliciadores ASM e harpina, em relação ao controle. Porém, houve aumento significativo de proteínas totais para todos os tratamentos com o passar do tempo em 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação dos eliciadores, quando comparados com avaliação realizada 24 horas antes da

aplicação, podendo se observar maior concentração de proteínas 72 horas após a aplicação dos eliciadores (Figura 09).

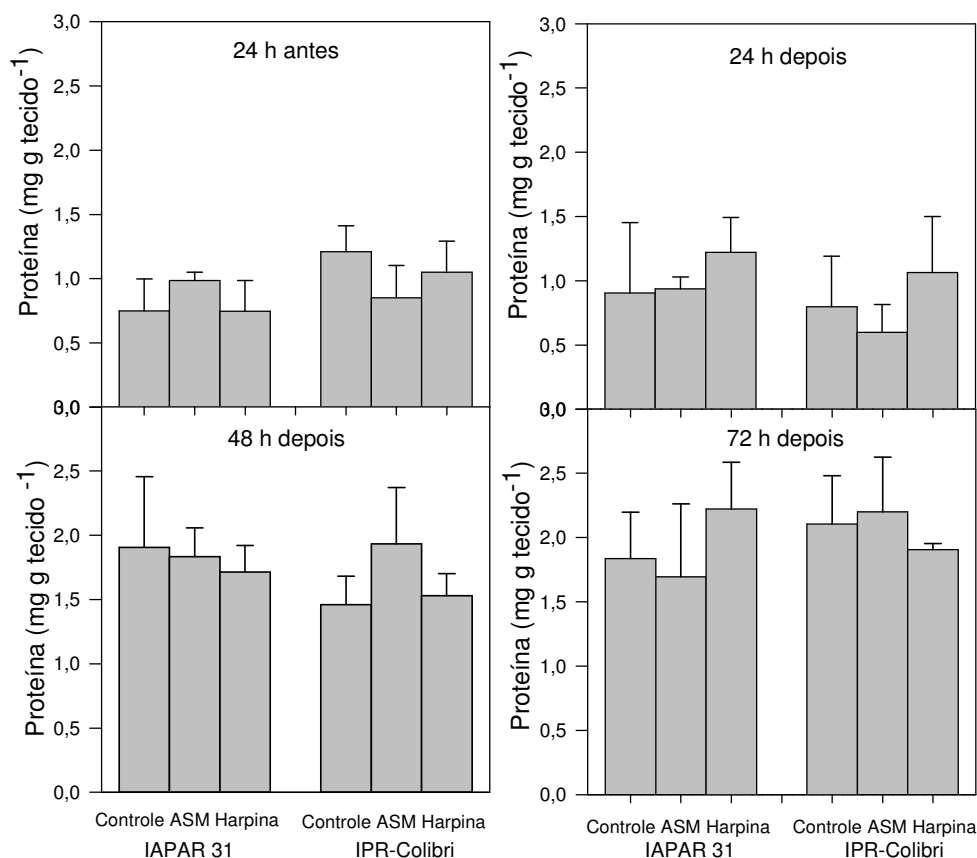


Figura 09. Concentração de proteínas totais 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% e CV (%) = 20,98.

Quando as plantas foram expostas ao patógeno, observou-se que as plantas que haviam sido tratadas com ASM apresentaram incrementos nas concentrações de proteínas totais em 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno na cultivar IAPAR 31 (Figura 10). Segundo Faulin (2010) o aumento de proteínas em plantas induzidas com ASM pode envolver a síntese das PRP's, além de outras proteínas relacionadas à defesa vegetal. O uso do eliciador ASM pode ter estimulado a produção de compostos do metabolismo vegetal e PRP's, sendo estas proteínas responsáveis pela defesa natural do vegetal contra os patógenos (DURRANT;

DONG, 2004). Tendência contrária foi observada nas plantas controle da cultivar IAPAR 31 onde houve redução na concentração de proteínas 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno. Essa redução na concentração de proteínas totais para o controle dessa cultivar, ocorrido 48 horas após a inoculação, pode ser devida ao direcionamento dessas proteínas para a produção de outros compostos também relacionados à defesa.

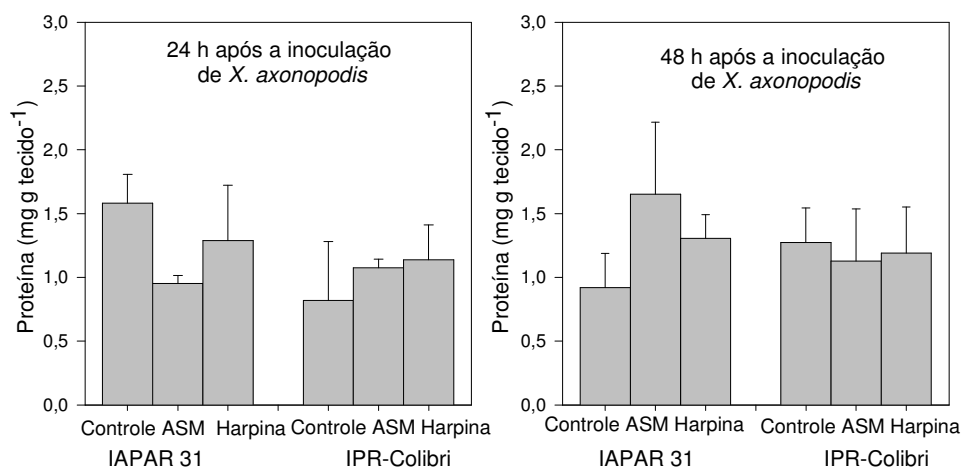


Figura 10. Concentração de proteínas totais das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.

Para a atividade de peroxidase não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com os eliciadores ASM e harpina, em relação ao controle (Figura 11). Embora sem diferenças significativas, as mesmas tendências de aumento para fenóis foram observadas para peroxidase em 24 e 72 horas depois da primeira aplicação dos eliciadores no tratamento com ASM para cultivar IPR-Colibri (Figura 11). Essa tendência de aumento de atividade da peroxidase também foi observada 72 horas depois da primeira aplicação dos eliciadores na cultivar IAPAR 31, nos tratamentos eliciados com ASM e harpina, em relação ao controle (Figura 11).

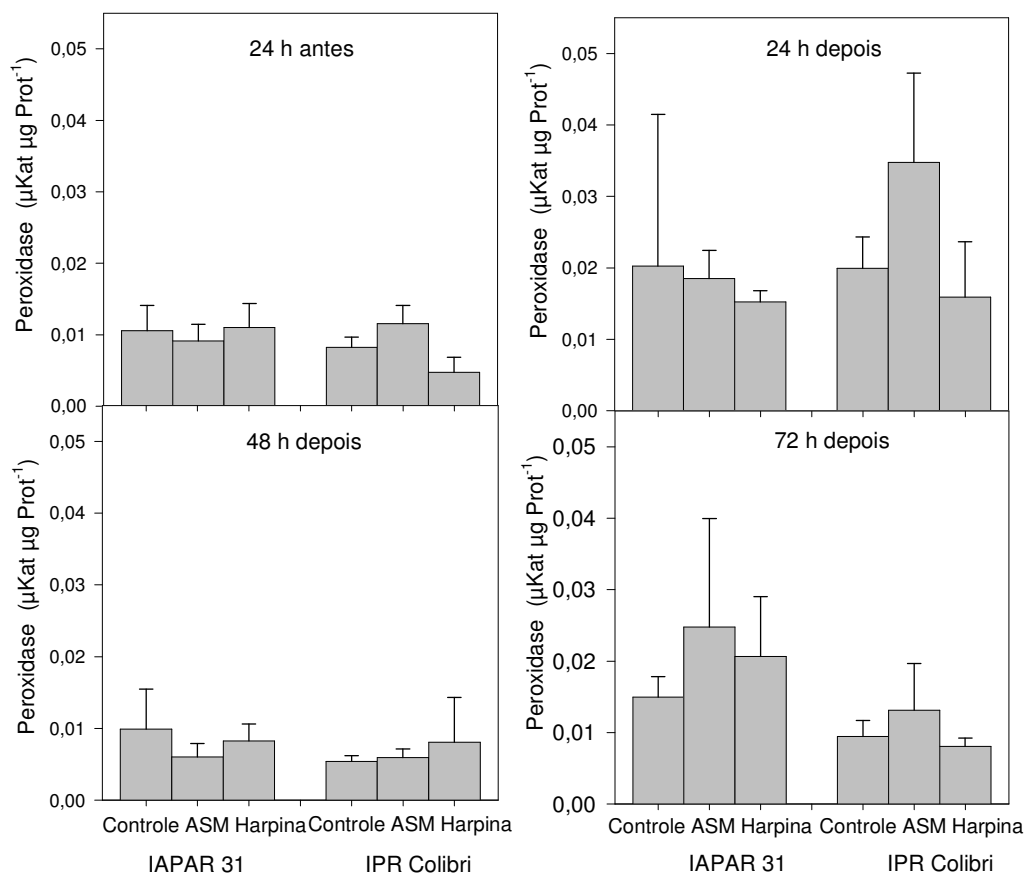


Figura 11. Atividade da enzima peroxidase 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de F ao nível de 5% e CV (%) = 54,71.

Os eliciadores ASM e harpina apresentaram diferenças significativamente superiores ao controle para atividade da enzima peroxidase na cultivar IAPAR 31 as 24 horas após a inoculação, e 48 horas após inoculação para a cultivar IPR-Colibri quando comparados com o controle (Figura 12).

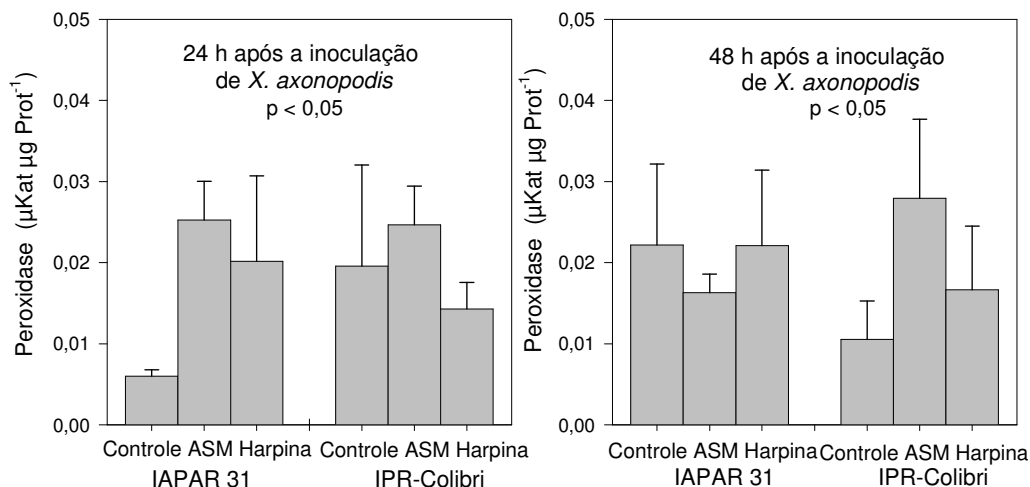


Figura 12. Atividade da enzima peroxidase das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.

Ainda com relação à Figura 12, observa-se que a aplicação do ASM foi mais efetiva no aumento da atividade da peroxidase para a cultivar IPR-Colibri considerada suscetível ao CBC, principalmente 48 horas após a inoculação. A cultivar IAPAR 31 demonstrou capacidade de responder ao ataque do patógeno 48 horas após a inoculação, mesmo nas plantas controle sem eliciação. Estes resultados são corroborados pelos obtidos na avaliação de severidade (Tabela 03) onde a cultivar moderadamente resistente IAPAR 31 não apresentou diferenças entre as plantas tratadas e controle, enquanto que a cultivar suscetível IPR-Colibri demonstrou severidade significativamente menor das plantas tratadas com ambos os eliciadores quando comparados ao controle. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por Kuhn (2007) que verificou maior atividade da enzima peroxidase em plantas de feijoeiro induzidas por ASM.

As plantas exibem várias respostas bioquímicas para proteção contra agentes oxidantes produzidos durante o metabolismo ou induzidos quando as plantas são submetidas a condições ambientais adversas (MITTLER, 2002). Dentre essas respostas a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MITTLER, 2002; RESENDE et al., 2003; SCANDALIOS, 2005) que pode ter ação tóxica direta sobre o patógeno, está envolvida no fortalecimento celular, sendo necessário para a biossíntese de

lignina (RESENDE et al., 2003) além de poder causar danos celulares e agir como moléculas sinalizadoras, que ativam múltiplas respostas de defesa (SOARES; MACHADO, 2007). No entanto, quando ocorre a superprodução das espécies reativas de oxigênio como o H_2O_2 , ocorre um estresse oxidativo nas células. Para que não ocorra a morte celular, mecanismos antioxidantes são ativados, como, por exemplo, a síntese de enzimas antioxidativas, dentre elas a enzima peroxidase. Iriti e Faoro (2003) demonstram que o uso do BTH pode induzir o acúmulo de H_2O_2 sem ocasionar a morte celular levando ao fortalecimento da parede celular das plantas.

Os mesmos autores demonstraram, em ensaio de cultivares de feijoeiro, que um único tratamento aplicado BTH nas folhas primárias da planta de feijão foi suficiente para o controle da ferrugem *Uromyces appendiculatus*, quando o fungo foi inoculado 7 dias depois de um período de indução.

Segundo Maffi et al. (2011) foi especulado que a eficácia dos tratamentos com o uso de BTH depois de um longo período de indução, pode ser devido ao tempo necessário para que ocorra o fortalecimento da parede celular da planta, servindo como barreira que impeça a penetração do fungo *U. appendiculatus*.

Rodrigues et al. (2006), aos cinco dias após a inoculação com o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, constaram um aumento na atividade da peroxidase na cultivar IPA-206 de feijão caupi, tratados com ASM; no entanto, aos 10 dias este efeito foi verificado tanto na cultivar IPA-206 como na BR-17 Gurguéia, em resposta ao mesmo indutor. Do mesmo modo, Campos et al. (2004) observou, em plantas de feijoeiro, que a atividade da peroxidase foi significativamente maior nas plantas tratadas com ácido salicílico e com o fungo eliciador, antes e após a inoculação do patótipo virulento. Birecka e Garraway (1978) também verificaram aumentos na atividade de peroxidase nos ferimentos mecânicos e tecidos infectados nas folhas de milho por *Helminthosporium maydis*, sendo a atividade da peroxidase percebíveis 24 horas após o ferimento.

O presente trabalho demonstrou que as plantas que receberam os eliciadores indicaram uma expressão da atividade da peroxidase, e a partir do momento em que as plantas foram expostas ao patógeno houve maior expressão desta enzima para a ambas as cultivares testadas, principalmente para a cultivar IPR-Colibri tratada com ASM. Além disso, o aumento na atividade da enzima peroxidase pode também ter proporcionado aumento na produção de lignina, um composto fenólico importante na

defesa estrutural contra patógenos o que provavelmente tenha influenciado diretamente nos níveis de severidade.

Para atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos com os eliciadores ASM e harpina, em relação ao controle. Independentemente de não haver resultado significativo, verificou-se uma tendência de aumento da atividade da enzima nos tratamentos 24 horas após aplicação dos eliciadores, principalmente nas plantas tratadas com harpina em ambas as cultivares. Já em 72 horas após a aplicação dos eliciadores, ambos os eliciadores elevaram a atividade da SOD apenas na cultivar IPR-Colibri (Figura 13).

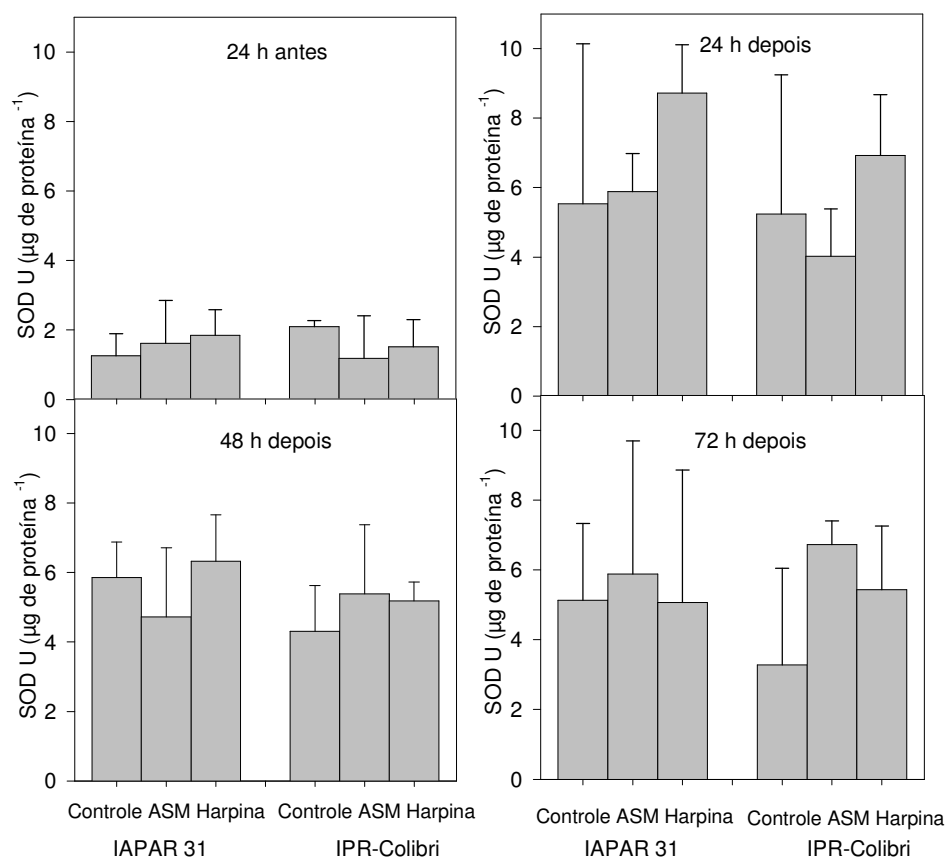


Figura 13. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) 24 horas antes e 24, 48 e 72 horas depois da aplicação dos eliciadores acibenzolar-S-metílico (ASM) e harpina, em plantas de feijoeiro, nos cultivares IAPAR 31 e IPR – Colibri. UTFPR, 2011. Interação não significativa pelo teste de Tukey ao nível de 1% e CV (%) = 46,71.

A tendência de aumento não foi confirmada após as plantas eliciadas serem expostas ao patógeno (24 e 48 horas após a inoculação), apenas o eliciador ASM

demonstrou uma tendência moderada de aumento da atividade da SOD para a cultivar IAPAR 31 no tratamento 48 horas após a inoculação quando comparado ao controle (Figura 14).

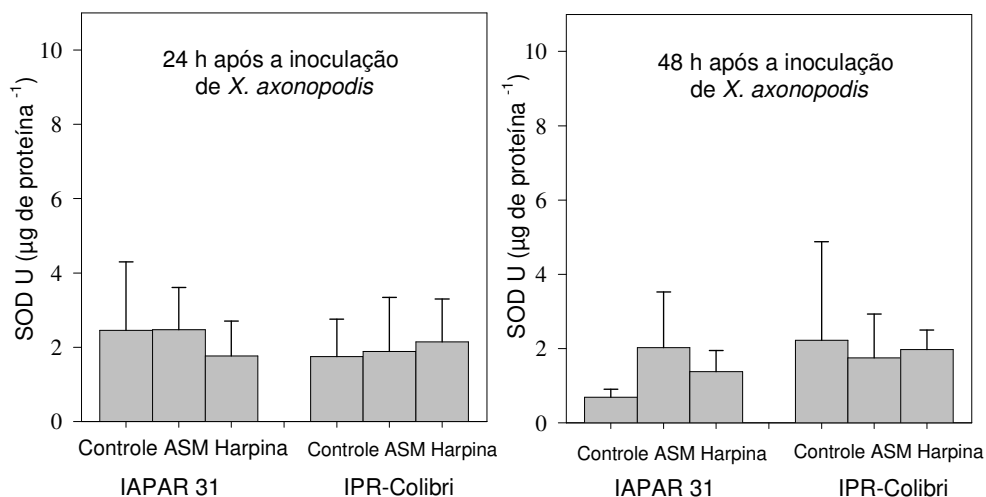


Figura 14. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das cultivares de feijoeiro IAPAR 31 e IPR Colibri, tratadas com os eliciadores acibenzolar-S-metilico (ASM) e harpina 24 e 48 horas após a inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, 2011.

As enzimas SOD apresentam aumento de atividade sempre que as plantas são submetidas a um ambiente estressante, como salinidade, altas temperaturas, estresse hídrico, alta intensidade luminosa, ataque fitopatogênico e ou insetos, entre outros (BROETTO et al., 2002).

As plantas possuem um sistema antioxidante para minimizar o efeito do estresse oxidativo, e a enzima superóxido dismutase é integrante desse sistema (MITTLER, 2002; SCANDALIOS, 2005; FELIPE et al., 2009), sendo responsável por catalisar a dismutação de um radical superóxido em peróxido de hidrogênio, podendo este ser tóxico ao patógeno (RESENDE et al., 2003; MAZARO, 2007).

Neste trabalho, de modo geral, houve expressão da enzima para as plantas tratadas após a primeira aplicação dos eliciadores (Figura 13). Porém, essa expressão da enzima SOD não foi confirmada após as plantas serem expostas ao patógeno (Figura 14).

5 CONCLUSÕES

Para o rendimento de grãos e seus componentes não foram observadas diferenças significativas entre o controle e os eliciadores ASM e harpina.

A aplicação de ASM e harpina proporcionou redução na severidade da doença do crestamento bacteriano comum nas plantas de feijoeiro da cultivar IPR-Colibri e a mesma tendência foi observada para a cultivar IAPAR 31 tratada com ASM.

As plantas da cultivar IAPAR 31 tratadas com o eliciador ASM apresentaram maiores taxas de assimilação de CO₂ quando comparadas ao controle e a mesma tendência foi observada para a cultivar IPR-Colibri.

A aplicação do ASM demonstrou induzir a síntese de compostos fenólicos e da enzima antioxidativa a peroxidase, especialmente na cultivar suscetível IPR-Colibri.

Os eliciadores ASM e harpina induziram os mecanismos de resistência em feijoeiro contra *X. axonopodis*, indicando a potencialidade do uso dos eliciadores na cultura do feijoeiro.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os indutores de resistência acibenzolar-S-metílico e proteína harpina se mostraram eficientes na indução de resistência contra o cretamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* nas plantas de feijoeiro.

Neste trabalho, a preservação dos tecidos fotossinteticamente ativos devido à redução da severidade do cretamento bacteriano comum, resultaram na maior taxa de assimilação de CO₂ para os tratamentos com ASM apresentando uma tendência do incremento do rendimento e seus componentes para o referido tratamento.

Estes eliciadores, além de incrementarem a atividade de enzimas antioxidantes relacionadas à defesa vegetal, possibilitaram o maior acúmulo de compostos fenólicos, conhecidos por sua ação antimicrobiana, um importante mecanismo da RSA envolvidos na indução de resistência para a cultura do feijoeiro.

Por apresentarem baixa toxicidade aos seres humanos e por agirem diretamente no metabolismo da planta, não apresentando qualquer efeito direto sobre os organismos alvo, esses produtos podem ser indicados para o manejo integrado de doenças.

Sendo assim, os eliciadores ASM e harpina demonstram-se promissores na indução de resistência à doença do cretamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro comum.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, J.; MOMBERG, M. R.; HEWITT, D.; HANSBERG, W. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. **Trends in Microbiology**, v.13, n. 3, 2005.
- BARROS, F.C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Biosci Journal**, v.26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BAYSAL, O; TURGUT, C; MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia plantarum**, v.49, n. 4, p. 599-604, 2005.
- BELTRAME, A. B. Interação *Phytophthora nicotianae* porta enxertos de citros (Tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular aspectos fisiológicos e bioquímicos. Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 2010.
- BENNETT, B. R.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytology**, v.127, p. 617-633, 1994.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) In: Kimati, H., Amorim, L., Rezende, J.A.M., Bergamin Filho, A. e Camargo, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v.2, 4 ed. São Paulo SP. Editora Ceres. p. 333-349, 2005.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.17, p.278-293, 1966.
- BIERECKA, H; GARRAWAY, M. Corn Leaf Isoperoxidase Reaction to Mechanical Injury and Infection with *Helminthosporium maydis*. **Plant Physiology**, v. 61, p. 561-566, 1978.
- BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. **A cultura**. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. Feijão. Viçosa: Ed. UFV, p. 13-18, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72 p. 248-254, 1976.
- BROETTO, F.; CROCOMO, O. J. Ação de luz UV e GA3 sobre a atividade de enzimas do metabolismo secundário em células de cenoura in vitro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.7, n.1, p.61-66, 1995.

BROETTO, F.; LUTTGE, U.; RATAJCZAK, R.; Influence of light intensity and salt treatment on mode of photosynthesis and enzymes of the antioxidative response system of *mesembryanthemum crystallinum*, **Functional Plant Biology**, Victoria, v.29, p. 13-23, 2002.

BROETTO, F.; MARCHESE, J. A.; LEONARDO, M.; REGINA, M. FUNGAL Elicitor-mediated changes in polyamine content, phenylalanine-ammonia lyase and peroxidase activities in bean cell culture. **General and Applied Plant Physiology**, 31(3-4): 235-246, 2005.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B. da; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.15, n.3, 129-134, 2003.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P. de; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CATANEO, A. C.; CHAMMA, K. L.; FERREIRA, L. C.; DESTRO, G. F. G.; SOUZA, D. C. F. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 4, n. 2, 2005.

CAVALCANTI, L.S. e RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar-S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, p.67-71, 2004.

CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO FEIJÃO. Disponível em: <<http://www.CENTRO...,feijao.com.br/index.php?p=historico>>. Acesso em: 29 jan. 2011.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A. Indução de Resistência no Manejo de Doenças Pós-colheita. In: RODRIGUES, F. Á; ROMEIRO, R. S da. Indução de resistência em plantas a patógenos. **Anais da III Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos** – Viçosa, MG, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira de grãos**. Quarto levantamento, janeiro 2011/ Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab, 2011.

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

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. F. G. de. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Revista Biotecnologia**, v. 10, p. 34-39, 1999.

DANNER, M.A.; SASSO, S.A.Z.; MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESI, J.A.; MAZARO, S. M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.7, p.793-799, 2008.

DONG, H.; DELANEY, T. P.; BAUER, D. W.; BEER, S. V. Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the 3IM1 gene. **The Plant Journal**, v. 20, n. 2, p. 207-215, 1999.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. Annual **Review of Phytopathology**, v. 42, p.185-209, 2004.

EMILIANI, G.; FONDI, M.; FANI, R.; GRIBALDO, S. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, v.4, n. 7, p. 1-12, 2009.

FAULIN, M.S.A.R. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil contra *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Parâmetros bioquímicos e da produção.** Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 2010.

FELIPE, R. T. A.; OLIVEIRA, J. A.; LEÃO, G. A. Potencial de *Cajanus cajan* e *Crotalaria spectabilis* para fitorremediação: absorção de arsênio e respostas antioxidativas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.33, n.2, p.245-254, 2009.

GIANNOPOLITIS, C.N. e RIES, S.K.; Superóxido dismutase. I. occurrence in higher plants **Plant Physiology**, v.59, p. 309-314, 1977.

GUZZO S.D.; HAKAKAVA, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: Sinalização e expressão de genes de defesa. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos. Viçosa: **Suprema**. p. 281-301, 2007.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA-JÚNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H. S. A.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.8, p. 1247-1252, 2006.

Instituto Agronômico do Paraná. **Cultivar de feijão IPR Colibri**. Disponível em <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/iprcolibri.pdf>. Acesso em: 09 maio. 2011 b.

Instituto Agronômico do Paraná. **Principais características das cultivares de feijão com Sementes.** Disponíveis No Mercado. Disponível em <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1363>>. Acesso em: 09 maio. 2011 a.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) Induces Cell-Death Independent Resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus* J. **Phytopathology**, v.151, p.171–180, 2003.

IRITI, M.; MAPELLI, S.; FAORO, F. Chemical-induced resistance against post-harvest infection enhances tomato nutritional traits. **Food Chemistry**.v.105, p.1040–1046, 2007.

ITO, F. M.; VITAL, W. M.; AKIRA ITO, M.; CARBONELL, S. A. M.; CHIORATO, A.F. **Seleção de genótipos de feijoeiro imunes e resistentes a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*** <<http://www.cnepaf.embrapa.br/conafe/pdf/conafe2005-0218.pdf>> Acesso em 27jul.2009.

JENNINGS, A.C. The determination AL dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v. 118, p. 396-398, 1991.

KUHN, J. O.; PASCHOLATI, S. P. Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In: RODRIGUES, F. A, ROMEIRO, R.S (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa. p.69, 2007.

KUHN, O. J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. Piracicaba, 2007, 140p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.107-114, 2010.

LABANCA, E. R. G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *colletotrichum lagenarium* e da síntese de glicolinas em soja (*Glycine Max*). Dissertação Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba. 2002.

LIMA, G.P.P.; ROSSI, C.; HAKVOORT, D.M.R. Atividade de peroxidases (E.C 1.11.1.7) e teor de prolina no embrião e cotilédones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**. v. 54 n. 3, 1997.

LOPES, L.P.; ALVES, P.F.R.; ZANDONÁ, C.; MEHTA, Y.R. A semi-selective médium to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds and its eradication

through seed treatment with tolylfluanid. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.3, p.287-288, 2008.

MACAGNAN, D. Indução de Resistência e Biocontrole em Cacaueiro. In: RODRIGUES, F. Á. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos. **Anais da III Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos** – Viçosa, MG, 2007.

MAFFI, D.; IRITI, M.; PIGNI, M.; VANNINI, C.; FAORO, F. Uromyces appendiculatus infection in bth-treated bean plants: ultrastructural details of a lost fight. **Mycopathologia**, v. 171, p. 209-221, 2011.

MARCHESE, J.A.; MATTANA, R.S.; MING, L.C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P.F.; MORAES, R.M. Irradiance stress responses of gas Exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba *Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel plants. **Photosynthetica**, v.46, n.4, p. 501-505, 2008.

MARINGONI, A. C. Virulência de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n.6, p. 861-867, 1998.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.4, p.535-532, 1999.

MARINGONI, A.C.; TORRES, J.P. Métodos de inoculação, estádios de desenvolvimento fenológico da planta e reação de cultivares de feijoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n.1, p.124-129, 1999.

MAZARO, S. M. **Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores**. Tese (Doutorado em agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007. 105p.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO. BION R 500 WG – registro no 05801. Brasil: **MAPA**, p.10, 2008.

MITLER, R. Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p.405-410, 2002.

MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasil**, n. 27, p. 175-190. 1992.

NAVARINI.L, G.D. CORTE, D. DEBONA, C. GULART, D.D. FAVERA, R.S. BALARDIN. Ação de acibenzolar-s-methyl isolado e em combinação com fungicidas no manejo de doenças na cultura do feijoeiro. **Arquivo Instituto Biológico**, São

Paulo, v.76, n.4, p.735-739, out./dez., 2009.

OBRADOVIC, A.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; BALOGH, B.; OLSON, S. M. Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. **Plant Disease**, v. 88, n. 7, p. 736-740, 2004.

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

OVERMYER, K.; BROSCHE, M.; KANGASJA, J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. **Trends in Plant Science**, v.8, n. 7, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; BLUMER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S. C. Indução De Resistência Novos Conceitos e Aplicações. **Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas** e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas. Lavras, MG, 2010.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-454, 1995.

PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, A.M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

PEREIRA, S.H.; SANTOS, B.J.; ABREU, A.F.B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agronômicas desejáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.3, p.209-215, 2004.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J. & VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Cell** v. 10, p.1571-80, 1998.

RAVA, C.A. **Doenças bacterianas**. Disponível: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_104_1311200215105.html>. Acesso em 14 jul. 2009.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p. 123-130, 2003.

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E. e COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. tracheiphilum em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

RODRIGUES, F. A.; FERNANDES, J. J.; MARTINS, M. Influencia de semeaduras sucessivas de feijoeiro na severidade da mancha-angular e ferrugem e perdas na produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34 n.8, 1999.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Metabólitos e Constituintes Bacterianos como Indutores de Resistência em Plantas a Patógeno. In: RODRIGUES, F. Á. et al. Indução de resistência em plantas a patógenos. **Anais da III Reunião Brasileira Sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos** – Viçosa, MG, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, p. 45, 1999.

SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D.; BRAMMER, S. P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n.1, p.29-37, 2009.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 38, p. 995-1014, 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow- mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, n.8, p.1051-1056, 1977.

SILVA, A DA; SANTOS, I; BALBINOTO, A.L; MATEI, G; OLIVEIRA, P.H. Reação de genótipos de feijão ao cretamento bacteriano comum, avaliado por dois métodos de inoculação. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 2019-2024, 2009.

SILVA, F. C. **Otimização da técnica de pcr para detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão**. Lavras, 2008, 57p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.

SILVA, R. A de.; **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos/** VERONICA MASSENA REIS, JOSÉ IVO BALDANI, FÁBIO LOPES OLIVARES. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 49 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, INSS 1517-8498; 250).

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropical** – Ciências Agrárias e Biológicas, v.1, n. 1, p. 9, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de adubação e de calagem**: para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10 ed. Porto Alegre: 2004.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35 p. 235-270. 1997.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOMAZELI, V. N. **Indução de resistência a doenças em morangueiro com o uso de Acibenzolar-S-Metil e Harpina em pré e pós-colheita**. Dissertação Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2010.

TORRES, J. P.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; MARINGONI, A.C. Detecção de *Xanthomonas axonopodispv. phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.136-139, 2009.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Biopesticide Regulatory Action** (Document /Harpina $\alpha\beta$ protein, PC Code 006506).USA, 2005, 23 p.

VIECELLI, C. A. **Controle da mancha angular e análises bioquímicas de resistência em feijoeiro tratados com extrato de *Pcynoporus sanguineus***. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon. 2008.

VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1998. 231 p.

WEI, Z.M.; LABY, R.J.; ZUMOFF, C. H.; BAUER, D.W.; HE, S.Y.; COLLMER, A.; BEER, S.V. Harpin Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia Amylovora*. **Science**, v.257, p.85-88, 1992.

ÍNDICE DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Croqui do experimento	64
--	----

