**ATIVIDADES DE RIBULOSE-1,5-BIFOSFATO CARBOXILASE (RUBISCO),
CLOROFILASE, β -1,3 GLUCANASE E QUITINASE E CONTEÚDO DE
CLOROFILA EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris*) INFECTADOS COM
Uromyces appendiculatus OU *Phaeoisariopsis griseola***

JOSÉ RENATO STANGARLIN

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Stangarlin, José Renato

Atividades de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), clorofilase, B-1,3 glucanase e quitinase e conteúdo de clorofila em cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) infectados com *Uromyces appendiculatus* ou *Phaeosariopsis griseola* / José Renato Stangarlin. - Piracicaba, 1999.

119 p. : il.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Enzima vegetal 2. Feijão 3. Ferrugem-do-feijão 4. Mancha-angular-do-feijoeiro 5. Metabolismo fotossintético 6. Relação hospedeiro-parasito 7. Resistência à doença 8. Variedade I. Título

CDD 635.652

“Mas o fruto do Espírito é: o amor, o gozo, a paz,
a longanimidade, a benignidade, a bondade, a
fidelidade,
a mansidão, o domínio próprio; contra estas
coisas não há lei.”
(GÁLATAS 5:22-23).

“Eu porém, cantarei a tua força; pela manhã
louvarei com alegria a tua benignidade,
porquanto tens sido para mim uma fortaleza, e
refúgio no dia da minha angústia.”
(SALMOS 59:16)

Aos meus pais, Antonio e Isabel,

Irmãos Marisa Angélica, Antonio Ricardo e José Adriano e

Sobrinhos Gabriel e Carolina,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço Senhor, em nome de Jesus, pela proteção que nos dá através de seus anjos acampados a nossa volta, pela sua misericórdia renovada sobre nós a cada manhã, pelos seus olhos voltados para nós, pelos seus ouvidos atentos ao nosso clamor e oração, e pela sua destra que nos sustenta em todos os momentos de dificuldades.

Meu muito obrigado ao companheiro e orientador Sérgio Florentino Pascholati, pelos dez anos de convivência e ensinamentos, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança e amizade.

À minha família, agradeço de coração pelo amor e incentivo que sempre me ofereceram e que tanto contribuíram para o término de meus trabalhos.

Um agradecimento muito especial para as queridas amigas Kátia Regina e Rosane Schwan, que mesmo a distância souberam me incentivar e me encorajar através de seus exemplos profissionais, que sempre oraram para que eu realizasse todos os meus desejos. Que Deus as abençoe!

No convívio do dia a dia, quantos amigos a minha volta! Obrigado Marise, Robson, Nelson, Everaldo e Thaís, Hélio, Fabiana, Célia, Cecília, Renata e Heloísa, Sílvia e Nilceli, Míriam e Fernando, pelos momentos agradáveis.

Agradeço aos amigos de Maringá, Reinaldo, Maria Eugênia, Solange, Renata, Ana, Taísa, Clóvis e Oscar, pela confiança que sempre depositaram em mim.

Ao Professor Carlos Alberto Labate, do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela orientação e cessão do seu laboratório para realizar as dosagens de rubisco.

Aos funcionários Marina, Jeferson, Edivaldo, Fernanda, Rodolfo e Pedro Artuso, e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP que sempre me atenderam com muita presteza.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Alterações fisiológicas do hospedeiro induzidas por fitopatógenos ...	4
2.2 Fotossíntese	6
2.2.1 Fase fotoquímica	6
2.2.2 Fase de fixação do CO ₂	9
2.2.3 Regulação da atividade da rubisco	11
2.2.3.1 Rubisco ativase	11
2.2.3.2 Inibidor da rubisco	13
2.2.4 Fotorrespiração	14
2.3 Alterações na fotossíntese	15
2.3.1 Alterações induzidas por patógenos biotróficos	17
2.3.2 Alterações induzidas por patógenos hemibiotróficos	20
2.4 Atividade de clorofilase	22
2.5 Respiração e patogênese	25
2.6 Mecanismos de defesa da planta hospedeira	26
2.6.1 Proteínas relacionadas à patogênese	27
2.7 Quantificação da colonização fúngica em tecidos vegetais através do ergosterol	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material vegetal	32
3.2 Obtenção e inoculação dos patógenos	33

3.2.1 <i>Uromyces appendiculatus</i>	33
3.2.2 <i>Phaeoisariopsis griseola</i>	33
3.3 Regiões avaliadas das plantas e coleta de amostras	35
3.4 Quantificação de clorofila	36
3.5 Atividade de clorofilase	37
3.5.1 Obtenção da preparação enzimática	37
3.5.2 Preparo do substrato para clorofilase	37
3.5.3 Determinação da atividade enzimática	38
3.6 Determinação da atividade de rubisco	38
3.6.1 Extração	38
3.6.2 Atividade inicial ou <i>in vivo</i>	39
3.6.3 Atividade total ou <i>in vitro</i>	39
3.7 Determinação da atividade de β -1,3 glucanase e quitinase	40
3.7.1 Extração de proteínas	40
3.7.2 Atividade de quitinase	41
3.7.3 Atividade de β -1,3 glucanase	41
3.8 Quantificação de ergosterol nos tecidos vegetais	42
3.9 Determinação do conteúdo total de proteínas	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Teor de clorofila e atividade de clorofilase no patossistema feijoeiro	
– <i>P. griseola</i> (mancha angular)	44
4.1.1 Cultivar Carioca	44
4.1.2 Cultivar Rosinha	45
4.1.3 Discussão	46
4.2 Teor de clorofila e atividade de clorofilase no patossistema feijoeiro	
– <i>U. appendiculatus</i> (ferrugem)	49
4.2.1 Cultivar Carioca	49
4.2.2 Cultivar Rosinha	50
4.2.3 Discussão	51

4.3 Atividade de rubisco no patossistema feijoeiro – <i>P. griseola</i> (mancha angular)	53
4.3.1 Cultivar Carioca	53
4.3.2 Cultivar Rosinha	54
4.3.3 Discussão	55
4.4 Atividade de rubisco no patossistema feijoeiro – <i>U. appendiculatus</i> (ferrugem)	58
4.4.1 Cultivar Carioca	58
4.4.2 Cultivar Rosinha	58
4.4.3 Discussão	59
4.5 Atividade de β -1,3 glucanase e quitinase	62
4.5.1 Patossistema feijoeiro – <i>P. griseola</i> (mancha angular)	62
4.5.2 Patossistema feijoeiro – <i>U. appendiculatus</i> (ferrugem)	63
4.5.3 Discussão	64
4.6 Quantificação da colonização fúngica	66
4.7 Discussão geral	67
4.7.1 Patossistema feijoeiro – <i>P. griseola</i>	67
4.7.2 Patossistema feijoeiro – <i>U. appendiculatus</i>	68
5 CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICE	112

LISTA DE FIGURAS

Página

1	Diagrama mostrando as respostas que se verificam no metabolismo do hospedeiro após o contato com o patógeno (Leite & Pascholati, 1995 - adaptado de Isaac, 1992)	4
2	Transporte eletrônico (esquema Z) acoplado com as reações fotoquímicas da fotossíntese (adaptado de Magalhães, 1985)	7
3	Estrutura química da clorofila <i>a</i> (Magalhães, 1985). A clorofila <i>b</i> possui o grupo aldeído (CHO) ao invés do grupo metil (CH ₃) da clorofila <i>a</i> ligado ao anel II	8
4	Espectro de absorção das clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> (Magalhães, 1985)	9
5	Os três estágios da fixação do CO ₂ em organismos fotossintéticos. Os números entre parênteses mostram a estequiometria dos três intermediários-chave (adaptado de Lehninger et al., 1995)	10
6	Base bioquímica da ativação da rubisco (Salvucci & Ogren, 1996)	12
7	Modo de ação da rubisco ativase (Salvucci & Ogren, 1996)	12
8	Ilhas verdes formadas em infecções por fungos biotróficos (ferrugens e oídios) (Leite & Pascholati, 1995 - adaptado de Isaac, 1992)	20
9	Quebra da molécula de clorofila por clorofilase (adaptado de Smart, 1994)	23

10	Esquema de inoculação e coleta das amostras	36
11	<p>Conteúdo de clorofilas <i>a</i> (A), <i>b</i> (B) e clorofila total (C) e atividade de clorofilase (D) em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com <i>P. griseola</i>. <u>Baixa</u> e <u>média</u>: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; <u>Doente</u>: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; <u>Cont.2</u> e <u>Cont.3</u>: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%</p>	70
12	<p>Conteúdo de clorofilas <i>a</i> (A), <i>b</i> (B) e clorofila total (C) e atividade de clorofilase (D) em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com <i>P. griseola</i>. <u>Baixa</u> e <u>média</u>: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; <u>Doente</u>: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; <u>Cont.2</u> e <u>Cont.3</u>: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%</p>	71
13	<p>Sintomas de mancha angular nas cultivares de feijoeiro Carioca (A) e Rosinha (B), 12 dias após a inoculação com <i>P. griseola</i></p>	72

- 14 Conteúdo de clorofilas *a* (**A**), *b* (**B**) e clorofila total (**C**) e atividade de clorofilase (**D**) em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 74
- 15 Conteúdo de clorofilas *a* (**A**), *b* (**B**) e clorofila total (**C**) e atividade de clorofilase (**D**) em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 75
- 16 Sintomas de ferrugem nas cultivares de feijoeiro Carioca (**A**) e Rosinha (**B**), 7 dias após a inoculação com *U. appendiculatus* 76

- 17 Atividades inicial (**A**) e total (**B**) e porcentagem de ativação (**C**) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *P. griseola*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 78
- 18 Atividades inicial (**A**) e total (**B**) e porcentagem de ativação (**C**) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *P. griseola*. Baixa, média e alta: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10%, 25-30% e 40-45%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 79
- 19 Atividades inicial (**A**) e total (**B**) e porcentagem de ativação (**C**) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 80

- 20 Atividades inicial (**A**) e total (**B**) e porcentagem de ativação (**C**) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 81
- 21 Atividade de β -1,3 glucanase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (**A**) e Rosinha (**B**), inoculadas com *P. griseola*. Baixa, média e alta: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10%, 25-30% e 40-45%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 82
- 22 Atividade de quitinase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (**A**) e Rosinha (**B**), inoculadas com *P. griseola*. Baixa, média e alta: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10%, 25-30% e 40-45%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. Barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste Tukey a 5% 83

- 23 Atividade de β -1,3 glucanase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (**A**) e Rosinha (**B**), inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 84
- 24 Atividade de quitinase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (**A**) e Rosinha (**B**), inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% 85

LISTA DE TABELAS

Página

- 1 Relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* presentes em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno *P. griseola*, respectivamente. Amostras coletadas 12' após a inoculação 73
- 2 Relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* presentes em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno *U. appendiculatus*, respectivamente. Amostras coletadas 7 dias após a inoculação 77
- 3 Quantidade de micélio de *P. griseola* presente em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno, respectivamente. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação 86
- 4 Quantidade de ergosterol de *U. appendiculatus* presente em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno, respectivamente. Amostras coletadas 7 dias após a inoculação 87
- 5 Sumário dos resultados referentes às alterações nas atividades de rubisco, clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase, e no conteúdo de ergosterol em cultivares de feijoeiro infectados com *P. griseola* ou *U. appendiculatus* 88

**ATIVIDADES DE RIBULOSE-1,5-BIFOSFATO CARBOXILASE (RUBISCO),
CLOROFILASE, β -1,3 GLUCANASE E QUITINASE E CONTEÚDO DE
CLOROFILA EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*)
INFECTADOS COM *Uromyces appendiculatus* OU *Phaeoisariopsis griseola***

Autor: JOSÉ RENATO STANGARLIN

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

A infecção por patógenos foliares pode interferir no aparato fotossintético em função da destruição de tecido fotossintetizante, decorrente da formação de lesões, bem como por alterações produzidas no metabolismo da área verde remanescente de folhas doentes, tais como na taxa de tomada de CO₂, no teor de pigmentos e nas atividades de enzimas do ciclo de Calvin. A intensidade dessas interferências depende do genótipo do hospedeiro, bem como do modo de colonização do patógeno. Dessa forma, este trabalho teve por objetivos verificar as modificações no conteúdo de clorofilas, nas atividades de clorofilase, ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (rubisco) e das enzimas de defesa vegetal β -1,3 glucanase e quitinase, em cultivares de feijoeiro com diferentes níveis de resistência à infecção pelos patógenos hemibiotrófico *P. griseola* (mancha angular) e biotrófico *U. appendiculatus* (ferrugem).

Plantas das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade aos patógenos, respectivamente, foram cultivadas em câmara-de-crescimento e inoculadas na 2ª folha trifoliolada com suspensão de conídios de *P. griseola* ou urediniósporos de *U. appendiculatus*. Após o aparecimento dos sintomas, foram coletadas amostras com baixa (5-10%) e média (25-30%) severidade na folha inoculada, bem como amostras da 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente. Por espectrofotometria determinou-se o conteúdo de clorofilas, as atividades de clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase. Foram

ainda determinadas as atividades de rubisco por método radiométrico e o teor de ergosterol por cromatografia líquida de alta pressão.

Os resultados obtidos mostraram que, baseadas nas atividades de clorofilase e rubisco, as alterações no metabolismo fotossintético, devido à infecção com os patógenos, são dependentes da cultivar em questão, bem como do tipo de região amostrada. Na cultivar Carioca, os efeitos negativos verificados na área verde remanescente aparentemente sadia da 2ª folha infectada com *P. griseola*, podem ser compensados pela manutenção dos níveis de clorofilas e pelos incrementos nas atividades de rubisco que ocorrem na 3ª folha não inoculada. Para a cultivar Rosinha, no entanto, os efeitos deletérios de *P. griseola* puderam ser observados tanto em folhas infectadas quanto em folhas distantes do local de infecção. A infecção por *U. appendiculatus* favoreceu a atividade de rubisco e o incremento no conteúdo de clorofilas tanto em folhas infectadas quanto em folhas sadias de plantas doentes da cultivar Rosinha, enquanto que para a cultivar Carioca, os efeitos não foram característicos. Os níveis de clorofilas estiveram relacionados à atividade de clorofilase em ambos os patossistemas. Ao contrário do que se observou a nível constitutivo, não houve relação entre as atividades de β -1,3 glucanase e quitinase induzidas após a infecção com os patógenos e o grau de resistência das cultivares. Em algumas combinações cultivares – patógenos houve relação inversa entre a indução das enzimas de defesa da planta e a atividade de rubisco.

**ACTIVITIES OF RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE (RUBISCO),
CHLOROPHYLLASE, β -1,3 GLUCANASE AND CHITINASE AND
CHLOROPHYLL CONTENT IN BEAN CULTIVARS (*Phaseolus vulgaris*)
INFECTED WITH *Uromyces appendiculatus* OR *Phaeoisariopsis griseola***

Author: JOSÉ RENATO STANGARLIN

Adviser: SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

Infection with leaf pathogens can interfere on the photosynthetic apparatus by reducing the photosynthesizing area due to lesion formation as well by changes in the metabolism of the remanescent green tissue of diseased leaves, such as CO₂ uptake, pigment content and activities of Calvin cycle enzymes. The level of interference depend upon the host genotype and how the pathogen colonizes the plant tissue. Thus, the present work was carried out to verify changes in chlorophyll content and in the activities of the enzymes chlorophyllase, rubisco, β -1,3 glucanase and chitinase in bean cultivars with differential responses to inoculation with the semibiotroph *P. griseola* and biotroph *U. appendiculatus* pathogens.

The bean cultivars "Carioca" and "Rosinha", showing moderate and high suscetibility to both pathogens, respectively, were grown inside growth chambers and were sprayed onto the 2nd trifoliate leaves with *P. griseola* conidia or *U. appendiculatus* urediniospores. When symptoms were visible, leaf discs were sampled from the inoculated tissue representing areas with low (5-10%) and medium (25-30%) severity, and from the 3rd non-inoculated leaves from diseased plants. Chlorophyll content and the activities of chlorophyllase, β -1,3 glucanase and chitinase were measured spectrophotometrically. On the other hand, rubisco activity was determined by a radiometric method and ergosterol content by high pressure liquid chromatograph.

The results showed that the changes in the photosynthetic metabolism, based on chlorophyllase and rubisco activities, depend upon host genotype and leaf area sampled. In the “Carioca” cultivar, the negative effects verified in the remanescent green area, apparently health of the 2nd trifoliate leaf infected with *P. griseola*, can be compensated by unchanged chlorophyll content and by an increase in rubisco activity in the 3rd trifoliate non-inoculated leaf. On the other hand, in the “Rosinha” cultivar, the deleterious effect of *P. griseola* infection occurred in both inoculated and non-inoculated leaves. The infection by *U. appendiculatus* increased rubisco activity and chlorophyll content in infected leaves and healthy leaves from diseased plants of “Rosinha” cultivar while in the “Carioca” cultivar the effects were not characteristics. Chlorophyll content showed an inverse correlation with chlorophyllase activity for both pathosystems. The induced activity of β -1,3 glucanase and chitinase was not correlated to the resistance level of the cultivars. To some cultivar – pathogen combinations, there was an inverse correlation between the induction of plant defense enzymes and rubisco activity.

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui-se em um dos alimentos básicos para a maioria da população brasileira, sendo cultivado desde o nível de agricultura de subsistência e com técnicas primitivas, até às grandes monoculturas altamente tecnificadas e irrigadas por pivô central (Del Peloso et al., 1997). Apesar dos incrementos na área de plantio e produtividade que vêm ocorrendo nos últimos anos, a produção nacional de feijão não tem sido suficiente para abastecer o mercado interno consumidor. Tal fato é reflexo de inúmeros fatores, como descaso ao setor agrícola por parte dos órgãos competentes, falta de planejamento, falta de apoio à pesquisa e de produção de sementes de qualidade, precariedade na orientação técnica da cultura, perdas pós-colheita e problemas fitossanitários causados por pragas e doenças (Fancelli & Dourado Neto, 1997).

A cultura do feijoeiro, em todas as regiões do mundo onde é praticada, pode ser afetada por mais de 300 doenças causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides, embora a grande maioria seja de ocorrência esporádica e sem importância econômica (Hall, 1991). No Brasil, doenças como mosaico dourado, crestamento bacteriano comum, mancha angular, ferrugem, antracnose, manchas de *Alternária* e de *Ascochyta*, oídio, mofo branco, mela, tombamento, murcha de *Fusarium*, podridão radicular seca, podridão cinzenta do caule e galhas das raízes, têm se destacado em função da frequência de aparecimento e dos danos causados à produção (Menezes & Menten, 1997).

Com relação à parte aérea da planta, o biotrófico *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger (ferrugem) e o hemibiotrófico *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (mancha angular) representam dois dos principais patógenos fúngicos do feijoeiro (Sartorato et al., 1996). O primeiro causa lesões foliares que surgem como pequenos pontos cloróticos que evoluem à pústulas brancas, que posteriormente rompem a epiderme expondo massa marrom-avermelhada formada pelos urediniósporos do fungo (Rios, 1994). O segundo causa lesões necróticas acinzentadas e delimitadas por nervuras, com amarelecimento e queda prematura de folhas (Sartorato & Rava, 1994). Em ambos os casos, portanto, a destruição de tecido fotossintético ocasionado por essas lesões é evidente, podendo implicar em redução do potencial produtivo da planta conforme a severidade de cada doença.

A interferência no aparato fotossintético não se limita, no entanto, apenas à destruição pelo patógeno de tecido foliar fotossintetizante no local da lesão (lesão real ou visual). Segundo Bastiaans (1991), a redução na fotossíntese em uma folha doente pode ocorrer também por alterações produzidas no metabolismo da área verde remanescente, a chamada lesão virtual. Assim, mudanças na taxa de tomada de CO₂, no teor de clorofila e na atividade da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (rubisco), responsável pela fixação de CO₂ na planta (Lehninger et al., 1995; Magalhães, 1985), poderiam modificar a eficiência fotossintética dessas áreas.

É possível que o tipo ou intensidade das modificações que ocorrem no hospedeiro estejam relacionados com o modo de colonização do patógeno. Enquanto os biotróficos obtêm seu alimento exclusivamente de tecido vivo do hospedeiro, os hemibiotróficos o fazem tanto de tecido vivo quanto de tecido necrosado (Luttrell, 1974), o que poderia indicar maior agressividade deste último em relação ao primeiro, implicando em alterações mais expressivas no metabolismo do hospedeiro, quer seja à nível de fotossíntese, quer seja à nível de respostas de defesa da planta frente à

infecção. Adicionalmente, dependendo do tipo de interação, muitas das atividades metabólicas e de crescimento do hospedeiro devem ser mantidas para que o patógeno sobreviva (Leite & Pacholati, 1995), e para que isso ocorra, um menor efeito deletério sobre a planta infectada deve ser esperado.

A maioria dos estudos desenvolvidos, visando-se à verificação dos efeitos de um patógeno sobre a fotossíntese da planta, quer seja à nível de taxa fotossintética, destruição de cloroplastos e clorofila ou ação sobre enzimas do ciclo de Calvin, são conduzidos sobre a folha infectada como um todo. Assim, esses tipos de resultados representam uma média do que ocorre sobre o metabolismo de tecidos não invadidos, bem como daqueles colonizados pelo patógeno. A verificação dos efeitos dessa infecção sobre o aparato fotossintético, amostrando-se regiões localizadas da folha doente, é essencial para uma melhor compreensão da interação planta-microrganismo patogênico.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivos: a) verificar, com base no conteúdo de clorofilas e na atividade das enzimas clorofilase e rubisco, a interferência no sistema fotossintético de cultivares de feijoeiro infectadas pelos patógenos hemibiotrófico *P. griseola* e biotrófico *U. appendiculatus*, através da amostragem de tecidos diretamente colonizados pelos fungos, bem como tecidos distantes do local de infecção; b) adicionalmente, estudar as respostas de defesa de cultivares altamente e moderadamente suscetíveis aos patógenos mencionados, com base nas atividades das enzimas β -1,3 glucanase e quitinase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alterações fisiológicas do hospedeiro induzidas por fitopatógenos

Após o contato entre fitopatógeno e hospedeiro e o desencadeamento de mecanismos de reconhecimento, ocorre o progressivo estabelecimento do processo de infecção (estabelecimento de relações parasitárias) e colonização inter ou intracelular, onde o patógeno avança em direção ao interior do tecido hospedeiro, comprometendo a integridade do mesmo e ocasionando modificações fisiológicas e bioquímicas (Leite & Pascholati, 1995). Algumas respostas que se verificam no metabolismo do hospedeiro, após o contato com o patógeno, estão representadas na **Figura 1**.

Figura 1 - Diagrama mostrando as respostas que se verificam no metabolismo do hospedeiro, após o contato com o patógeno (Leite & Pascholati, 1995 - adaptado de Isaac, 1992).

De forma geral, os distúrbios fisiológicos induzidos por fitopatógenos no hospedeiro podem ocorrer por alterações:

a) na permeabilidade da membrana plasmática: havendo a perda de eletrólitos, de substâncias em geral e da capacidade de acumular sais minerais. Isso pode ocorrer pela ação de toxinas seletivas e não seletivas ao hospedeiro (Pascholati, 1995a; Pascholati et al., 1998) e pela degradação dos constituintes da membrana plasmática por fosfolipases e proteases (Pascholati, 1995b; Pascholati et al., 1998);

b) nas relações hídricas: devido à presença do próprio patógeno ou de substâncias com elevada massa molecular produzidas pelos fitopatógenos no interior dos vasos condutores do xilema (Mepsted et al., 1995); à degradação dos tecidos condutores ou ao acúmulo de géis produzidos em função da ação de enzimas degradadoras da parede celular (Pascholati, 1995b); à formação de tiloses (Pascholati & Leite, 1995) e à incrementos na taxa transpiratória (Ayres, 1995) devido à rupturas na cutícula e interferência no comportamento de abertura/fechamento dos estômatos (Isaac, 1992);

c) na transcrição: em geral, a transcrição de DNA em RNA é sempre afetada em tecidos infectados, sendo este efeito mais facilmente notado em interações onde o patógeno e o hospedeiro mantêm íntimo contato, como em infecções causadas por vírus e fungos causadores de ferrugem (Agrios, 1997);

d) na tradução: o aumento na síntese de proteínas que se observa em tecidos infectados pode ser encarado como resultante da ação do patógeno durante a colonização do hospedeiro, e deste durante a sua defesa para evitar o estabelecimento de relações parasitárias. Os incrementos na atividade de enzimas respiratórias, enzimas envolvidas com a fotossíntese e enzimas relacionadas com o metabolismo dos fenilpropanóides em tecidos infectados têm sido correlacionados com a ativação de mecanismos de reparo desses tecidos vegetais (Agrios, 1997);

e) no equilíbrio hormonal: podendo redirecionar a atividade metabólica do hospedeiro para favorecer o desenvolvimento do patógeno. Sintomas do tipo galhas, superalongamentos, nanismo, enfezamento, murchas, abscisão foliar, epinastia e ilhas verdes são característicos de desequilíbrios hormonais na planta doente (Isaac, 1992);

f) no metabolismo de carboidratos: deficiências no sistema fotossintético, juntamente com distúrbios na respiração podem comprometer a reserva de carboidratos do hospedeiro atacado por patógenos. Os mecanismos envolvidos em cada uma dessas funções básicas serão discutidos posteriormente, enfatizando-se o processo fotossintético.

2.2 Fotossíntese

A fotossíntese é um processo onde os organismos ditos fotossintetizadores captam a energia solar e sintetizam ATP e NADPH, que usam como fonte de energia para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de CO_2 e H_2O , liberando simultaneamente, O_2 na atmosfera (Salisbury & Ross, 1992). Este processo primordial do qual depende toda a vida terrestre (Conn & Stumpf, 1990) é conduzido em duas fases: a fotoquímica (ou reação luminosa) e a fixação do carbono, as quais serão comentadas a seguir.

2.2.1 Fase fotoquímica

Nesta fase, a clorofila e outros pigmentos das células fotossintetizadoras absorvem a energia luminosa, havendo a excitação e a transferência de elétrons através de sistemas de transporte eletrônico (fotossistemas FSI e FSII) e de elementos transportadores de elétrons (**Figura 2**). Todas as células fotossintetizantes produtoras de O_2 (as das plantas superiores, algas e cianobactérias) contêm ambos os fotossistemas I e II; todas

as outras espécies de bactérias fotossintetizantes, que não produzem O_2 , contêm apenas o fotossistema I (Lehninger et al, 1995).

Durante a fase fotoquímica, grande parte da energia luminosa absorvida (97%) é conservada na forma química de dois produtos ricos em energia, o ATP (produzido por fotofosforilação) e o NADPH, havendo a liberação de O_2 resultante da hidrólise da água. Parte da luz absorvida é perdida como calor (2,5%) ou por reemissão como fluorescência (0,5%) (Bolhàr-Nordenkamp & Öquist, 1993). Alterações nos valores de fluorescência têm sido usados para estudo da ação de patógenos sobre a fotossíntese de plantas doentes (Berghaus et al., 1987; Peterson & Aylor, 1995; Raggi, 1995).

Figura 2 - Transporte eletrônico (esquema Z) acoplado com as reações fotoquímicas da fotossíntese (adaptado de Magalhães, 1985).

A fase fotoquímica ocorre nos cloroplastos das células dos organismos eucarióticos fotossintetizantes (plantas verdes superiores e algas) e nos cromatóforos das células procarióticas (algas azuis e bactérias verdes e púrpuras) (Conn & Stumpf, 1990). Os pigmentos que absorvem a luz estão arranjados em conjuntos ou feixes funcionais chamados de fotossistemas. Os

mais importantes pigmentos absorvedores de luz são as clorofilas, podendo haver também os pigmentos acessórios como os carotenóides (β -caroteno e xantofila) e as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina) (Lehninger et al., 1995). A estrutura química da clorofila *a* está representada na **Figura 3**.

Figura 3 - Estrutura química da clorofila *a* (Magalhães, 1985). A clorofila *b* possui o grupo aldeído (CHO) ao invés do grupo metil (CH₃) da clorofila *a* ligado ao anel II.

Embora ambas as clorofilas *a* e *b* sejam verdes, seus espectros de absorção são ligeiramente diferentes (**Figura 4**), permitindo aos dois pigmentos complementarem mutuamente o alcance da sua absorção de luz na região do visível. Em geral, a maioria das plantas possui duas a três vezes mais clorofila *a* do que clorofila *b* (Lehninger et al., 1995).

Figura 4 - Espectro de absorção das clorofilas a e b (Magalhães, 1985).

2.2.2 Fase de fixação do CO₂

As plantas verdes contêm nos cloroplastos uma maquinaria enzimática única que cataliza a conversão do CO₂ em compostos orgânicos simples (reduzidos); utilizando os ATP e NADPH produzidos na fase fotoquímica. Posteriormente, esses produtos simples são convertidos em biomoléculas complexas, incluindo açúcares, polissacarídeos e metabólitos derivados dos mesmos (Lehninger et al., 1995). Qualquer mudança na atividade fotossintética das folhas será refletida na taxa de assimilação de CO₂ pela mesma (Long & Hällgren, 1993).

Em relação à fixação do CO₂, a mesma ocorre em três estágios (**Figura 5**):

1º estágio: o CO₂ sofre uma condensação com um receptor com cinco átomos de carbono, a ribulose-1,5-bifosfato (RuBP), havendo uma clivagem do intermediário instável de seis carbonos para formar duas moléculas de 3-fosfoglicerato (com três carbonos cada). A enzima que cataliza esta reação é a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase. Esta enzima também pode atuar como oxigenase, resultando na fotorrespiração. Desta forma, tem-se a enzima

ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase ou simplesmente **rubisco** (EC 4.1.1.39) (Conn & Stumpf, 1990);

2º estágio: o 3-fosfoglicerato é reduzido à gliceraldeído-3-fosfato. Uma molécula desta triose pode ser empregada para produção de energia via glicólise e ciclo do ácido cítrico, ou condensada em hexoses fosfato para ser empregada na síntese do amido ou da sacarose;

3º estágio: cinco das seis moléculas de gliceraldeído-3-fosfato (15 carbonos ao todo) são empregadas para regenerar três moléculas de RuBP, o material inicial. Assim, o processo global é cíclico (também conhecido como ciclo de Calvin ou ciclo das plantas C₃, como o feijoeiro) e permite a contínua conversão de CO₂ em triose e hexose fosfato.

Figura 5 - Os três estágios da fixação do CO₂ em organismos fotossintéticos. Os números entre parênteses mostram a estequiometria dos três intermediários-chave (adaptado de Lehninger et al., 1995).

2.2.3 Regulação da atividade da rubisco

A rubisco é a enzima chave na produção de biomassa a partir de CO_2 , e a mais abundante na biosfera, não ocorrendo em animais. Está localizada no estroma do cloroplasto e representa até perto de 50% da proteína total do mesmo (algo próximo de 250 mg/ml) (Lehninger et al., 1995). Nos vegetais, a rubisco apresenta uma estrutura complexa, com massa molecular relativa (M_r) de 550 kDa, formada por oito grandes subunidades (cada uma com M_r de 56 kDa) e oito subunidades pequenas (cada uma com M_r de 14 kDa). As grandes subunidades, cada uma contendo um sítio ativo, são produzidas a partir de informações presentes no DNA do cloroplasto, enquanto as unidades pequenas, cuja função ainda não é bem compreendida, são produzidas a partir do DNA da célula. Em bactérias fotossintéticas, a estrutura da rubisco é muito diferente, com duas subunidades semelhantes àsquelas grandes subunidades da enzima vegetal (Gutteridge, 1990).

A enzima rubisco está sujeita à regulação pela adição covalente de uma molécula de CO_2 (não é a mesma molécula de CO_2 que está ligada à RuBP na reação catalizada por esta enzima) ao grupo ϵ -amino de um determinado resíduo de lisina para formar um grupo carbamato. Este carbamato liga-se ao íon magnésio (Mg^{2+}), formando um complexo essencial para a atividade enzimática (**Figura 6**) (Gutteridge, 1990; Lehninger et al., 1995; Salvucci & Ogren, 1996). Além dessa incorporação de CO_2 ao resíduo de lisina, a rubisco pode estar sujeita a outros tipos de regulação, conforme serão comentados a seguir.

2.2.3.1 Rubisco ativase

Em níveis altos de CO_2 , a incorporação dessa molécula ao resíduo de lisina ocorre de forma não enzimática. Entretanto, o substrato para a rubisco, a RuBP, inibe essa incorporação, podendo este efeito ser quase completo em concentrações fisiológicas de CO_2 (Portis, 1990). A enzima

Figura 6 - Base bioquímica da ativação da rubisco (Salvucci & Ogren, 1996).

rubisco ativase supera esta inibição e promove a ativação da rubisco, dependente de ATP. O mecanismo de ativação é desconhecido e não está claro porque o ATP é necessário (Portis, 1990, 1992; Lehninger et al., 1995).

A **Figura 7** mostra o modo de ação da rubisco ativase (Salvucci & Ogren, 1996). A rubisco ativase contendo ATP interage com a rubisco inativada contendo RuBP fortemente ligada ao sítio ativo. A hidrólise do ATP causa uma mudança conformacional, alterando o sítio ativo da rubisco, permitindo a dissociação de RuBP e a incorporação de CO_2 . A interação entre rubisco ativase e rubisco pode envolver tanto as grandes quanto as pequenas subunidades. Há indicação de que a enzima rubisco ativase seja constituída de dois polipeptídeos com Mr de 41 e 45 kDa, respectivamente (Salvucci et al., 1985, 1987).

Figura 7 - Modo de ação da rubisco ativase (Salvucci & Ogren, 1996).

2.2.3.2 Inibidor da rubisco

A rubisco pode ser inibida por um análogo do estado de transição, o 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (CA1P), que ocorre naturalmente e que possui uma estrutura similar àquela do intermediário β -cetoácido da reação da rubisco (Portis, 1990). Este composto é sintetizado na ausência de luz por algumas plantas para reprimir a atividade da rubisco. O mecanismo é quebrado quando a luz retorna, permitindo a reativação da enzima (Lehninger et al., 1995; Portis, 1992). Essa reação de degradação do CA1P é catalizada por uma enzima localizada no estroma do cloroplasto, a CA1P fosfatase, a qual produz carboxiarabinitol (CA) e fosfato inorgânico como produtos (Seemann et al., 1990). O análogo do estado de transição é uma molécula estável, capaz de se ligar a uma enzima mais fortemente do que o substrato no complexo enzima-substrato, pois supostamente ajusta-se melhor ao sítio ativo (ou seja, deve formar um maior número de interações fracas) que o próprio substrato (Lehninger et al., 1995).

Embora menos estudados, outros dois compostos, a xilulose-1,5-bifosfato e o 3-cetoarabinitol-1,5-bifosfato têm sido reconhecidos como inibidores potencialmente importantes da atividade da rubisco (Portis, 1990, 1992).

Em feijoeiro (*P. vulgaris*), e em algumas outras espécies de plantas, a regulação da atividade da rubisco em função da quantidade de CA1P varia conforme a intensidade luminosa. Sob baixa densidade de fluxo de fótons ou no escuro, a concentração de CA1P é alta nas folhas, e começa a diminuir com o incremento na intensidade luminosa, ocorrendo o inverso com a atividade da rubisco (Seemann et al., 1990). Kobza & Seemann (1989) e Holbrook et al. (1991) verificaram que em feijoeiro, em apenas 10 minutos, havia uma redução de quase 100% na concentração de CA1P quando as plantas, que estavam no escuro, eram expostas a intensidade luminosa de $1100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Em trabalhos anteriores, Sage et al. (1988) haviam definido

que para o feijoeiro, intensidades luminosas de 1000-1100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, consideradas altas, eram as que proporcionavam melhores taxas de fotossíntese, enquanto que intensidades de 300-350 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, consideradas baixas, além de resultarem em menor fotossíntese, permitiam a detecção de CA1P. Em condições de 800-850 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ as taxas de fotossíntese foram muito semelhantes àsquelas encontradas para intensidades luminosas mais altas.

Sage et al. (1993) encontraram em seus experimentos que, embora o incremento na concentração de CA1P, que ocorre depois de poucas horas de escuro ou baixa intensidade luminosa, domine a regulação da atividade da rubisco em *P. vulgaris*, nos momentos iniciais é a perda de CO_2 da enzima o processo mais proeminente na resposta regulatória.

2.2.4 Fotorrespiração

A especificidade da rubisco para o CO_2 como substrato não é absoluta. O oxigênio (O_2) compete com o CO_2 pelo sítio ativo da enzima, havendo a condensação de O_2 com RuBP para formar uma molécula de 3-fosfoglicerato e uma de fosfoglicolato, caracterizando a atividade de oxigenase da enzima. Em seguida, ocorre a conversão de duas moléculas de fosfoglicolato em uma molécula de serina, havendo o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 (fotorrespiração) (Lehninger et al., 1995).

Nas plantas C4 o CO_2 é fixado em um composto com quatro átomos de carbono, o oxaloacetato, através do substrato fosfoenolpiruvato (três carbonos) e a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase. Nessas plantas o CO_2 é primeiramente fixado nas células mesofílicas em um composto que, posteriormente, passa para as células envoltórias do feixe, onde o CO_2 é liberado em altas concentrações. O CO_2 é então fixado nas células da bainha do feixe (ambiente pobre em O_2) pela rubisco e as reações remanescentes do ciclo de Calvin ocorrem como nas plantas C3 (Conn & Stumpf, 1990).

2.3 Alterações na fotossíntese

Comumente se encontra na literatura que a invasão da planta por um patógeno causa redução na capacidade fotossintética do hospedeiro devido à destruição de tecido verde, e portanto, redução na interceptação da radiação solar. Entretanto, com frequência não são discutidos os efeitos deletérios aos tecidos adjacentes não infectados, ou mesmo, mudanças em determinadas etapas do processo fotossintético (Lucas, 1998). Bastiaans (1991) sugere que nem sempre a estimativa visual da severidade (porcentagem de tecido foliar com sintomas) reflete adequadamente o efeito do patógeno na atividade fotossintética da folha.

A redução na fotossíntese de folhas infectadas por patógenos pode ocorrer devido a muitos mecanismos, didaticamente divididos em físicos e celular/metabólicos (ou “lesões bioquímicas”) (Scholes, 1992):

A) Mecanismos físicos:

1. Mudança na taxa de tomada de CO₂ devido a alterações no comportamento de abertura/fechamento dos estômatos; dificuldade de difusão de CO₂ no mesófilo foliar (Bowden et al., 1990);
2. Diminuição na interceptação da radiação solar como consequência de desfolha ou mudanças na forma e orientação das folhas (Madeira & Clark, 1995);
3. Redução ou destruição de moléculas de clorofila (sintoma de clorose) ou de cloroplastos (sintoma de amarelecimento) como resultado do surgimento de áreas cloróticas e necrosadas (Leite & Pascholati, 1995). A permanência de lesões necróticas nas folhas, além de comprometer a recepção da luz, causa um sombreamento nas folhas inferiores, que têm assim, menor atividade fotossintética (Madeira & Clark, 1995).

B) Mecanismos celular/metabólicos (“lesões bioquímicas”):

1. Incremento na respiração do hospedeiro e/ou fungo;
2. Alteração na relação de solutos nas células do hospedeiro (Goodman et al., 1986);
3. Inibição na cadeia transportadora de elétrons devido à perda de componentes ou ação de toxinas produzidas pelo patógeno (Agrios, 1997);
4. Redução na quantidade e/ou atividade de enzimas do ciclo de Calvin: rubisco, frutose-1,6-bifosfatase, 3-fosfoglicerato quinase;
5. Acúmulo de carboidratos causando inibição pelo produto final (retroinibição) e regulação da expressão gênica (Jang & Sheen, 1994; Sheen, 1990);
6. Sequestro de fósforo inorgânico (Pi) do citoplasma do hospedeiro pelo fungo.

Esses dois últimos mecanismos celular/metabólicos poderiam conduzir a uma redução na reciclagem de Pi para o cloroplasto, restringindo a síntese de ATP e de 3-fosfoglicerato. Como consequência, a síntese de amido no cloroplasto é estimulada e a taxa de fotossíntese é reduzida (Scholes, 1992). O efeito do acúmulo de sacarose, glicose e frutose sobre a síntese de sacarose, e de uma forma mais geral, sobre a taxa de fotossíntese, vai depender da distribuição desses carboidratos entre os compartimentos celulares e do fluxo entre células. Se estes carboidratos estiverem predominantemente no apoplasto, vacúolo ou nas células da epiderme, a fotossíntese não será afetada, pelo menos a curto prazo. Entretanto, se o acúmulo ocorrer no citosol, a fotossíntese poderá sofrer inibição pelo produto final (via limitação de Pi) ou, a um longo prazo, por um decréscimo na síntese de enzimas do metabolismo fotossintético.

Com base nesses mecanismos, serão discutidas, a seguir, as alterações induzidas por patógenos biotróficos e hemibiotróficos que ocorrem na fotossíntese.

2.3.1 Alterações induzidas por patógenos biotróficos

Patógenos biotróficos são aqueles que retiram seu alimento unicamente de células vivas do hospedeiro, causando o menor dano possível. Fazem parte deste grupo todos os micoplasmas, algumas bactérias e os fungos causadores de ferrugens, carvões, oídios e míldios (Amorim, 1995; Luttrell, 1974). Também compreende os vírus e viróides que dependem da célula viva do hospedeiro para sua sobrevivência.

De forma geral, patógenos biotróficos de folhas podem causar um estímulo temporário na taxa fotossintética, embora em muitas interações patógeno-hospedeiro possa haver declínio dessa taxa e perda de clorofila dos tecidos diante do progresso da infecção (Scholes, 1992). Além disso, patógenos biotróficos geralmente causam incrementos na taxa respiratória e alteram a quantidade e translocação de carboidratos em folhas infectadas.

Abo-Foul et al. (1996) estudando o patossistema pepino – *Sphaerotheca fuliginea* concluíram que a redução na capacidade fotossintética ocorria devido à perda de clorofila (reduzindo a absorção de luz), danos aos tilacóides (prejudicando as reações luminosas) e perda de estroma (incluindo enzimas do ciclo de Calvin).

Scholes et al. (1994) verificaram que em folhas de cevada infectadas com *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a inibição na taxa de fotossíntese ocorria inicialmente como resultado da perda de atividade e/ou quantidade de enzimas do ciclo de Calvin, como frutose-1,6-bifosfatase e rubisco. Com o progresso da infecção havia aumentos nas taxas de ribulose-1,5-bifosfato : ácido-3-fosfoglicérico e de triose-fosfato : ribulose-1,5-bifosfato, a primeira indicando uma restrição na carboxilação de CO₂ (consistente com o decréscimo na atividade total da rubisco), e a segunda indicando uma restrição na regeneração de ribulose-1,5-bifosfato (consistente com o decréscimo no estado de ativação de frutose-1,6-bifosfatase). Paralelamente a esses eventos

havia um incremento na atividade de invertase ácida (ou mesmo de uma α -glucosidase, possivelmente de origem fúngica) e, conseqüentemente, acúmulo de glicose e frutose. Estes carboidratos, além de retroinibirem o ciclo de Calvin, exerciam um efeito direto na redução da expressão de genes que codificam enzimas do metabolismo fotossintético. Também ocorreu inibição do transporte eletrônico em função do decréscimo na demanda de ATP e NADPH, da fotoinibição e da perda acelerada de clorofila das folhas.

O incremento na atividade de invertase em tecidos infectados pode estar relacionado à grande demanda em energia e fontes de carbono que são empregados na resposta de defesa da planta (Benhamou et al., 1991) ou às alterações nas relações “fonte-dreno” para suprir o patógeno com esqueletos de carbono durante a patogênese.

Estes mesmos mecanismos de redução da taxa fotossintética também foram relatados em outros patossistemas. Scholes & Rolfe (1995) trabalhando com *Albugo candida* e *Arabidopsis thaliana*, verificaram que a inibição na atividade da rubisco era acompanhada por um incremento na atividade de invertase e acúmulo de carboidratos. Na interação *Puccinia coronata* - aveia esses mesmos autores observaram que a fotossíntese variava consideravelmente em diferentes regiões da folha infectada, com o maior declínio ocorrendo nas áreas colonizadas pelo fungo e em áreas adjacentes, em comparação com folhas sadias. Chou et al. (1995) no patossistema *A. candida* - *A. thaliana* mostraram que nas áreas da folha onde o micélio fúngico estava presente havia uma redução na taxa de fotossíntese, perda de clorofila, acúmulo de carboidratos solúveis e perda de amido, enquanto que em áreas adjacentes o efeito no metabolismo era similar, porém menos severo.

Outros trabalhos também têm mostrado reduções diferenciais na fotossíntese de folhas infectadas conforme a região avaliada. Murray & Walters (1992) verificaram uma diminuição da taxa fotossintética em folhas de *Vicia faba* inoculadas com *Uromyces vicia-fabae*, enquanto que nas folhas

superiores não inoculadas, de plantas infectadas, a fotossíntese, bem como a resistência à ferrugem, eram incrementadas. Dessa forma, essas folhas apresentavam menor área coberta com sintomas e menor número de pústulas por cm². A resistência à ferrugem foi maior quando essas folhas superiores foram inoculadas até 1 dia depois da inoculação nas folhas inferiores. No entanto, quando através de sombreamento, a fotossíntese das folhas superiores era reduzida para valores próximos daqueles das plantas controle (não inoculadas), havia um decréscimo na resistência à ferrugem, embora não em proporção à redução da fotossíntese. Com isso, os autores sugeriram que o incremento na fotossíntese das folhas superiores não infectadas provavelmente facilitaria a expressão máxima da resistência das mesmas.

Berghaus & Reisener (1985) observaram que em materiais de trigo moderadamente resistentes à *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* havia uma redução da fotossíntese, acompanhada por diminuição no conteúdo de clorofila, ao redor do sítio de infecção, redução comparativamente maior do que a ocorrida em cultivares suscetíveis. A diminuição de fotoassimilados ao redor da lesão contribuiria para limitar o crescimento micelial do fungo na cultivar resistente. Esta é uma resposta diferente daquela que se encontra em algumas ferrugens e oídios com o fenômeno de formação de ilhas verdes.

Ilhas verdes correspondem a áreas infectadas onde a clorofila é mantida, provavelmente devido à mudanças no nível de citocininas ao redor dos sítios de infecção (**Figura 8**). Essas áreas são circundadas por um halo clorótico característico (Isaac, 1992; Leite & Pascholati, 1995). Pode haver grande variação com relação ao padrão de formação de ilhas verdes (Sziráki et al., 1984). Em plantas infectadas com fungos causadores de oídio, as ilhas verdes resultam de uma nova síntese de clorofila após uma destruição inicial devido à infecção. No caso das ferrugens, a formação resulta da retenção no nível de clorofila ao redor das áreas colonizadas pelo patógeno.

Outra consequência da infecção por patógenos biotróficos é a alteração nos níveis de mRNA que codificam as subunidades da rubisco. Higgins et al. (1985) verificaram que em folhas de cevada, a quantidade de cada um dos tipos de mRNA que codificam as subunidades pequenas e grandes da rubisco foi reduzida após a infecção com *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*.

Figura 8 - Ilhas verdes formadas em infecções por fungos biotróficos (ferrugens) (Leite & Pascholati, 1995 - adaptado de Isaac, 1992).

2.3.2 Alterações induzidas por patógenos hemibiotróficos

Patógenos hemibiotróficos são aqueles que atacam células vivas, podendo contudo, desenvolver-se e esporular mesmo após a morte dos tecidos. Fazem parte deste grupo muitos fungos causadores de mancha foliar, como os dos gêneros *Cercospora* e *Septoria*, e causadores de murchas vasculares como *Fusarium* e *Verticillium* (Amorim, 1995; Luttrell, 1974).

Há vários trabalhos mostrando alterações na fotossíntese, através de mecanismos físicos, causadas por patógenos hemibiotróficos (Madeira & Clark, 1995). Estes mecanismos incluem perda de área foliar, interceptação da luz pelas lesões as quais, além de não contribuírem para a fotossíntese, causam

sombreamento nas folhas inferiores, e mudanças na geometria foliar com influência direta na interceptação de luz. Pesquisas mais refinadas, no entanto, têm sido desenvolvidas procurando verificar o efeito de mecanismos celular/metabólicos, ou a bioquímica da fotossíntese de plantas infectadas por esses patógenos.

Kombrink & Hahlbrock (1990) realizaram um trabalho com batata e *Phytophthora infestans* com o objetivo de verificar se os efeitos negativos da infecção fúngica sobre os níveis de mRNA que codifica as subunidades pequenas da rubisco são locais ou sistêmicos, se esses efeitos são causados apenas pela repressão da atividade de transcrição ou se são meramente reflexos do decréscimo da estabilidade dos mRNA em tecidos doentes. Os autores observaram que tanto a infecção das folhas com *P. infestans*, quanto o tratamento com preparação elicitora obtida da cultura líquida do fungo, causaram uma redução nos níveis de mRNA que codificam rubisco, bem como nos níveis da enzima, devido à rápida e sistêmica repressão gênica. Ao mesmo tempo que ocorria essa repressão, havia a ativação para a transcrição de genes codificando β -1,3 glucanase envolvida na resposta de defesa do hospedeiro. Resultados semelhantes de repressão de mRNA para rubisco também foram observados por Ranty et al. (1987) no patossistema *Colletotrichum lagenarium* - melão, e por Mouly et al. (1988) no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum* - girassol.

A tagetitoxina, uma toxina produzida por *Pseudomonas syringae* pv *tagetis*, também é capaz de causar alteração nos níveis de rubisco em folhas de trigo. Lukens et al. (1987) verificaram que a toxina induzia sintomas de clorose em folhas em desenvolvimento, mas não em folhas maduras, e que também reduzia os níveis de mRNA que codifica as grandes subunidades da rubisco. O nível do mRNA para as subunidades pequenas da enzima era detectado somente em quantidades-traço em folhas tratadas com a toxina.

O efeito de *Verticillium albo-atrum* na fotossíntese de clones resistente e suscetível de alfafa foi estudado por Pennypacker et al. (1990). Nenhuma redução na fotossíntese, na atividade total da rubisco e na condutância estomatal foi detectada no clone resistente infectado, enquanto que no clone suscetível, a fotossíntese, a atividade e quantidade de rubisco e a condutância estomatal foram significativamente reduzidas. Em trabalhos posteriores com o mesmo patossistema (Pennypacker et al., 1994, 1995) foi observado que em plantas resistentes infectadas, quando cultivadas sob baixa intensidade luminosa, havia redução na fotossíntese e na quantidade total de rubisco, a resistência ao patógeno era atenuada e as plantas comportavam-se como fenotipicamente suscetíveis. A perda da resistência quando condições ambientais reduzem a fotossíntese sugere que a assimilação de carbono seja um fator crítico para a defesa do hospedeiro. *Verticillium* sp obtém energia para colonização pela degradação enzimática de esqueletos de carbono do hospedeiro, o que pode induzir as respostas de defesa deste último, através por exemplo, do caminho dos fenilpropanóides, o que requer incrementos no fluxo de carbono (Pennypacker & Leath, 1993).

A grande maioria dos trabalhos que buscam estudar o efeito da infecção com patógenos biotróficos ou hemibiotróficos sobre o aparato fotossintético do hospedeiro, o fazem através de estudos fisiológicos, verificando essencialmente a taxa fotossintética de plantas ou folhas doentes como um todo. A bioquímica fotossintética, nesses casos, não é levada em consideração, deixando-se assim de elucidar os mecanismos pelos quais a fotossíntese pode ser alterada.

2.4 Atividade de clorofilase

A clorose, um sintoma muito comum em plantas doentes, é um indicativo da redução do teor de clorofila em tecidos verdes. Essa redução

pode ser uma consequência da quebra enzimática da clorofila, inibição da sua síntese ou mesmo redução no número de cloroplastos (Lucas, 1998).

A clorofilase (EC 1.1.14) é uma enzima encontrada nos tilacóides dos cloroplastos e cuja atividade está correlacionada com a perda de clorofila (Smart, 1994). Como este pigmento também está localizado nos tilacóides, o mecanismo pelo qual o contato entre enzima e substrato é controlado *in vivo* permanece um mistério, embora haja evidências de que a clorofila esteja complexada a apoproteínas (Thomas et al., 1989) e de que a enzima possa estar latente sob condições naturais (Schoch & Brown, 1987). Amir-Shapira et al. (1986) sugerem que a quebra da clorofila pela ação da clorofilase pode ser iniciada quando a enzima e o substrato entram em contato, através da ruptura da membrana dos tilacóides por ação mecânica ou pelo tratamento com detergentes.

O primeiro passo na quebra enzimática da clorofila (**Figura 9**) é a remoção da cadeia fitol do anel de porfirina, resultando em clorofilídeo e fitol (Holden, 1961). Posteriormente há a conversão do clorofilídeo à feorforbídeo pela Mg-dequelatase e, finalmente, a ação de uma deoxigenase originando uma cadeia tetrapirrólica aberta (Vicentini et al., 1995).

Figura 9 - Quebra da molécula de clorofila por clorofilase (adaptado de Smart, 1994).

A atividade de clorofilase tem sido estudada principalmente no processo de senescência de plantas ou mesmo em maturação de frutos. O mais óbvio sintoma da senescência foliar é o amarelecimento, devido à maior retenção de carotenóides em relação a clorofilas, que são degradadas. Isto ocorre porque a combinação de clorofila, luz e oxigênio em folhas senescentes produz radicais livres que poderiam destruir a compartimentalização celular e impedir, assim, a reciclagem de nutrientes para o resto da planta (Matile et al., 1989). Sabater & Rodríguez (1978) verificaram que a clorofilase parece ser responsável pela degradação de clorofila durante a senescência de folhas destacadas de aveia. Em canola, a degradação de clorofila durante a maturação de sementes está associada com o incremento da atividade de clorofilase e também de peroxidase (Johnson-Flanagan & Spencer, 1996). Rodríguez et al. (1987) também encontraram forte correlação entre o conteúdo de clorofila e o incremento na atividade de clorofilase durante a senescência de folhas destacadas de cevada. Esses autores defendem a hipótese de que a clorofilase tem um papel importante no catabolismo de clorofila durante a senescência das folhas, e que a regulação hormonal da degradação da clorofila pode ser, em parte, devido à regulação da enzima.

A infecção de plantas por patógenos conduz frequentemente ao desenvolvimento de clorose nas folhas, o que poderia ser devido à degradação da clorofila, redução na síntese de clorofila ou combinação de ambos os processos. São raros no entanto, trabalhos mostrando o envolvimento de clorofilase na degradação de clorofila e, conseqüentemente, interferência no aparato fotossintético de plantas doentes. Bailiss (1970) verificou que em cotilédones de pepino infectados com o vírus do mosaico do pepino ("Cucumber Mosaic Virus - CMV") havia o aparecimento de lesões cloróticas que resultavam em clorose generalizada dos cotilédones, o que era acompanhado de incrementos na degradação de clorofila e na atividade de clorofilase.

2.5 Respiração e patogênese

Como visto, a fotossíntese, de forma geral, é menor em uma folha doente, e, associado a isto, há o crescimento do patógeno nos tecidos consumindo fotoassimilados, além da biossíntese e acúmulo de compostos relacionados à resposta de defesa do hospedeiro (Farrar, 1992). Como consequência, há a utilização de carboidratos de reserva e a respiração em tecidos infectados é incrementada, pois é necessário aumento na atividade metabólica para suprir as demandas de energia e de esqueletos de carbono dos processos biossintéticos. Esses incrementos na taxa respiratória normalmente ocorrem logo após o início da infecção e permanecem elevados até a fase de esporulação do patógeno, podendo diminuir quando este cessa o seu desenvolvimento e o processo de degeneração do tecido infectado tem início (Leite & Pascholati, 1995).

De forma resumida, o aumento da respiração em plantas doentes pode ocorrer devido à combinação de um ou mais dos seguintes mecanismos (Hutcheson & Buchanan, 1983): a) mecanismo de proteção do tecido infectado, como o isolamento e regeneração desses tecidos através de lignina e suberina; b) desacoplamento na mitocôndria do transporte de elétrons para síntese de ATP, por ação de toxinas produzidas pelo patógeno; c) aumento do consumo de ATP, NADPH e outros compostos ricos em energia através do aumento generalizado da atividade biossintética; d) aumento na atividade de enzimas envolvidas na degradação de carboidratos; e) perda da compartimentalização de enzimas e metabólitos-chave, em função do aumento na permeabilidade da membrana (possivelmente pela ação de toxinas); f) aumento dos níveis de alguns substratos, como amido e açúcares solúveis que se acumulam, resultando em bloqueio de translocação; g) aumento na atividade de oxidases envolvidas na biossíntese de compostos secundários, como fenilpropanóides, incluindo lignina, flavonóides, isoflavonóides, cumarinas, etc.

Diferentes comportamentos podem ser esperados em plantas infectadas por fungos biotróficos ou hemibiotróficos. Na infecção de cevada com o biotrófico *E. graminis* f.sp. *hordei* ocorre um forte aumento na atividade respiratória três dias após a inoculação, permanecendo alta até a senescência da folha. O fungo provavelmente age como um dreno metabólico causando um incremento no fluxo de nutrientes através da planta e provavelmente um estímulo da atividade fotossintética. Ainda em cevada, mas agora com o hemibiotrófico *Pyrenophora teres*, o incremento na respiração torna-se notável já com 24 horas depois da infecção e alcança o máximo após sete dias. Com o avanço da necrose, a taxa respiratória diminui até níveis não mensuráveis depois de dez dias. Provavelmente as toxinas produzidas pelo fungo causem um desacoplamento da fosforilação oxidativa, com rápido e marcante efeito nas membranas das células do hospedeiro (Isaac, 1992).

2.6 Mecanismos de defesa da planta hospedeira

A resistência do hospedeiro a um patógeno pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno nos tecidos da mesma (Goodman et al., 1986). Para atingir esse objetivo a planta utiliza-se de fatores de resistência ou mecanismos de resistência divididos em duas categorias: pré-formados, presentes na planta antes do contato com o patógeno e capazes de reduzir a germinação e penetração do mesmo e consequentemente o número de lesões por folha, e pós-formados, que mostram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno e que interferem no tamanho das lesões e esporulação (Horsfall & Cowling, 1980; Misaghi, 1982). Segundo Pascholati & Leite (1994, 1995) esses mecanismos compreendem, por exemplo:

A. Pré-formados (passivos ou constitutivos):

a) estrutural: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;

b) bioquímico: fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, fototoxinas, quitinases e β -1,3 glucanases.

B. Pós-formados (ativos ou induzíveis):

a) estrutural: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses;

b) bioquímico: fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese.

A sequência de eventos relacionados à indução e expressão da resistência ou resposta de defesa, inicia-se com o reconhecimento pelo hospedeiro de alguma característica química ou estrutural do patógeno, ou agente de estresse ou dano associado com a invasão. Esta percepção resulta na produção ou liberação de um composto sinalizador que é responsável pela indução da resposta de defesa (Johal et al., 1995).

2.6.1 Proteínas relacionadas à patogênese

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) foram detectadas pela primeira vez no início da década de 70 em folhas de fumo Samsun NN exibindo reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico (TMV)(Van Loon & Van Kammen, 1970). Este foi o sistema que permitiu a caracterização da maior parte das proteínas-RP até agora conhecidas, embora algumas dessas proteínas também possam ser induzidas em plantas sob condição de estresse, recebendo neste caso a denominação de proteínas de estresse (Linthorst, 1991).

Na reação de hipersensibilidade há o fenômeno da complementariedade entre genes de virulência do patógeno e genes de resistência da planta, havendo a formação de lesões necróticas ao redor do sítio inicial de ataque do patógeno, restringindo-o a essa região. Nessa região pode haver o acúmulo de derivados da via metabólica dos fenilpropanóides, de fitoalexinas, carboidratos (calose), glicoproteínas ricas em hidroxiprolina,

polímeros aromáticos como lignina e outros fenóis, além das proteínas-RP (Ebel, 1986).

Algumas das mudanças mencionadas acima podem também ser induzidas à distância do sítio de infecção, em partes não infectadas da planta, como é o caso das proteínas-RP, cuja produção em folhas de fumo não inoculadas representa 5-10 % da sua produção em folhas inoculadas e com reação de hipersensibilidade. Essa resposta de defesa sistêmica é acompanhada pelo fenômeno de resistência sistêmica adquirida (RSA), onde partes não infectadas da planta mantêm-se em "estado de alerta" devido ao fato de outras partes da planta já terem reagido hipersensitivamente ao patógeno (Ross, 1961). Acredita-se que as proteínas-RP contribuam para a eficiência da RSA pelo fato de serem induzidas paralelamente a esta resposta, embora isto ainda não tenha sido claramente comprovado. No entanto, elas servem como um sensível marcador para pesquisas sobre um possível "sinal" (ou fator ativo imunizante) que se move dos sítios primários de infecção para áreas distantes (Graham & Graham, 1991).

As proteínas-RP apresentam propriedades físico-química típicas que as distinguem das demais proteínas encontradas em plantas (Stintzi et al., 1993):

- São estáveis em pH baixos, em torno de 2,8 (quase a totalidade das demais proteínas das plantas precipitam nesta condição);
- Mostram-se resistentes à ação de enzimas proteolíticas. Desde que as proteínas-RP ácidas de fumo localizam-se no espaço intercelular das folhas, que é uma região de pH relativamente baixo (devido ao colapso dos tecidos e liberação de ácidos vacuolares e que também contém atividade de protease ácida), parece que essas proteínas-RP são adaptadas a essa condição;
- Geralmente mostram-se como monômeros, com peso molecular variando entre 8 e 50 kDa;

- Podem estar localizadas no vacúolo (formas básicas), parede celular e/ou apoplasto (formas ácidas);
- São estáveis sob altas temperaturas (em torno de 60-70 °C).

Baseado em características serológicas, peso molecular e composição de aminoácidos as proteínas-RP de fumo são separadas em cinco grupos (Stintzi et al., 1993; Vigers et al., 1991): Grupo 1: compreende as formas ácidas RP-1a, -1b e -1c e a forma básica RP-1g; Grupo 2: caracterizado pelas β -1,3 glucanases; Grupo 3: caracterizado pelas quitinases; Grupo 4: neste grupo estão as proteínas r1, r2 e s2 isoladas de folhas de fumo infectadas com TMV; Grupo 5: com dois componentes quase neutros, extracelulares, de massa molecular de 24 kDa (proteínas R e S) e dois componentes neutros de massa molecular de 22 kDa e encontrados em vacúolos de células de fumo em resposta a estresse osmótico (osmotina e *n*-osmotina).

As enzimas β -1,3 glucanases (EC 3.2.1.39) e quitinases (EC 3.2.1.14) exibem ação direta nas hifas invasoras (ação fungicida ou ação antimicrobiana direta), com a consequente liberação de elicitores oligossacarídicos a partir das paredes celulares fúngicas (constituídas basicamente de glucana e quitina em muitas espécies de fungos) (Griffin, 1994). Esses elicitores poderiam levar à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência nas plantas (ação antimicrobiana indireta) (Boller & Metraux, 1988) e dessa forma restringir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais. Caso essas formas extracelulares de β -1,3 glucanases e quitinases não sejam capazes de impedir o crescimento do patógeno nos tecidos vegetais, ocorreria o colapso da célula e a liberação das formas intracelulares básicas dos vacúolos.

2.7 Quantificação da colonização fúngica em tecidos vegetais através do ergosterol

O ergosterol é o principal componente da membrana plasmática fúngica, estando presente somente em células vivas do fungo (Griffin, 1994). Não faz parte dos tecidos vegetais e por esse motivo permite uma excelente quantificação da biomassa do fungo que está colonizando a planta (Seitz et al., 1977, 1979). Dessa forma é possível estabelecer uma correlação entre as respostas de defesa da planta em determinadas regiões da folha e a presença ou não do fungo nestes tecidos. Além disso, o estudo das mudanças no metabolismo fotossintético de plantas doentes é difícil, pois as folhas infectadas mostram-se frequentemente heterogêneas, sendo constituídas de células diretamente invadidas pelo patógeno e células que não são invadidas, mas que são modificadas pela presença do patógeno na folha, indicando, portanto, a conveniência de se verificar a extensão da invasão fúngica (Scholes e Rolfe, 1995).

A estimativa da quantidade de micélio fúngico presente nos tecidos vegetais poderia ser realizada também, através de métodos envolvendo a análise de quitina, um componente da parede celular fúngica (Griffin, 1994). No entanto, esses métodos são muito laboriosos e com menor especificidade e sensibilidade quando comparados com métodos envolvendo a determinação de ergosterol através de cromatografia líquida de alta pressão (Johnson & McGill, 1990).

O método de dosagem do ergosterol pode ser amplamente utilizado para se quantificar a colonização de raízes por fungos micorrízicos (Galli, 1996; Johnson & McGill, 1990; Martin et al., 1990; Nylund & Wallander, 1992; Salmanowicz & Nylund, 1988; Schwan-Estrada, 1997) e determinar a extensão da invasão fúngica em cereais e sementes armazenadas (Gordon & Webster, 1984; Seitz et al., 1977, 1979). Pode ainda ser usado para quantificar

a biomassa fúngica no solo (Davis & Lamar, 1992) e o crescimento fúngico em substratos sólidos e líquidos (Matcham et al., 1984; Perez, 1996).

A dosagem de ergosterol já foi utilizada também em estudos envolvendo a reação de materiais vegetais resistentes à infecção com o patógeno. Griffiths et al. (1985) realizaram um bioensaio com ergosterol para verificar a resistência de folhas de trigo a *Septoria nodorum*. Gretenkort & Ingram (1993) utilizaram o ergosterol como uma medida quantitativa da resistência de cultura de tecidos de *Brassica napus* sp. *oleifera* a *Leptosphaeria maculans*. Stangarlin (1995) observou a colonização do patógeno *Exserohilum turcicum* em diferentes tipos de lesões e regiões de folhas de milho de genótipos resistente e suscetível, através da quantificação de ergosterol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Os experimentos foram realizados em condições de ambiente controlado (câmara-de-crescimento), utilizando duas variedades de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), com as seguintes características de resistência aos patógenos (Rios, 1994; Sartorato & Rava, 1994):

- Carioca Comum: moderadamente suscetível a *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*;
- Rosinha G-2: altamente suscetível a *U. appendiculatus* e *P. griseola*.

Sementes pré-germinadas foram utilizadas para maximizar a velocidade de emergência e garantir uniformidade de plantas. Para tanto, estas receberam uma desinfecção superficial prévia por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (produto comercial: água, 1:3 partes, v/v) durante 10 a 15 min, após rápida imersão em álcool etílico comercial. A seguir, as sementes foram mantidas em água destilada à temperatura ambiente para hidratação. Decorridas 18 h, as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo papel de filtro umedecido, sendo incubadas por 2 dias a 25 °C e escuro, para germinação. As sementes pré-germinadas foram plantadas em vasos de alumínio contendo 1,5 l de uma mistura de solo com matéria orgânica autoclavados. As plantas assim obtidas (duas plantas/vaso), foram mantidas em câmara-de-crescimento (Conviron – modelo S10H) sob fotoperíodo de 12 h ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ das 6:00 às 18:00 h), umidade relativa de 40-60% e temperatura constante de 24 °C.

3.2 Obtenção e inoculação dos patógenos

3.2.1 *Uromyces appendiculatus*

Urediniósporos de *U. appendiculatus* foram coletados de plantas de feijão infectadas naturalmente e que se encontravam no campo experimental do Departamento de Fitopatologia (ESALQ/USP). A multiplicação dos urediniósporos foi realizada inoculando-se uma suspensão dos mesmos sobre os folíolos de plantas das variedades Rosinha e Carioca. Após a inoculação, as plantas foram cobertas com saco plástico, constituindo uma câmara-úmida, e mantidas assim e no escuro a 21 °C por 24 h, sendo depois incubadas em câmara-de-crescimento e fotoperíodo de 12 h ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), umidade relativa de 40-60% e temperatura constante de 21 °C (Bassanezi, 1995). Quando as pústulas iniciaram a esporulação, os urediniósporos foram coletados agitando-se os folíolos sobre uma folha de papel. Posteriormente, foram colocados em cápsulas de gelatina e no interior de frascos de vidro fechados, contendo sílica gel, e armazenados em congelador (-20 °C) até o momento da inoculação.

A suspensão de esporos foi preparada em água com Tween 20 (1 gota/100 ml), sendo a concentração ajustada para 4×10^4 urediniósporos/ml. A inoculação, decorridos 14 dias do plantio das sementes pré-germinadas, foi realizada na 2ª folha trifoliolada ainda não completamente desenvolvida (**Figura 10**), mantendo-se as mesmas condições descritas anteriormente. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo cada repetição constituída de um vaso com duas plantas.

3.2.2 *Phaeoisariopsis griseola*

O fungo *P. griseola* foi isolado a partir de folhas de feijoeiro com sintomas de mancha angular provenientes do campo experimental do Departamento de Fitopatologia (ESALQ/USP). Com o auxílio de uma agulha e

de um microscópio estereoscópico, os conidióforos contendo conídios foram tocados levemente com a agulha previamente flambada e resfriada em BDA (batata-dextrose-ágar), evitando-se tocar a superfície da folha. Tanto os conídios quanto os pequenos fragmentos do meio de cultura foram imediatamente transferidos para placas de Petri contendo BDA, as quais foram mantidas em estufa a 24 °C e escuro até que houvesse um crescimento micelial (Sartorato, 1989). O fungo assim isolado foi repicado para tubos de ensaio com meio inclinado de suco de tomate (200 ml de suco de tomate integral + 15 g de ágar + 4,5 g de CaCO_3 + 800 ml de água destilada) (Dalla Pria & Bergamin Filho, 1995). Os tubos foram mantidos sob as mesmas condições anteriores e quando se percebeu a esporulação (± 7 dias após a repicagem), adicionou-se 2 ml de água destilada estéril aos tubos. Após agitação, 100 μl da suspensão resultante foi transferida para placas de Petri contendo meio de suco de tomate. A suspensão foi espalhada por toda a superfície do meio com o auxílio de uma alça de Drigalski e as placas foram vedadas com filme plástico para manter a umidade (Bassanezi, 1995). As placas foram deixadas em estufa a 24 °C e escuro por 2 a 3 semanas até que se observasse intensa produção de conídios por toda a superfície do meio.

Para o preparo do inóculo, as culturas fúngicas em placas de Petri com meio de suco de tomate, foram lavadas com água destilada estéril contendo Tween 20 (1 gota/500 ml). A suspensão obtida foi filtrada em gaze e a concentração de conídios ajustada em câmara de Neubauer para 4×10^4 conídios/ml.

A inoculação, decorridos 14 dias do plantio das sementes pré-germinadas, foi realizada na 2ª folha trifoliolada ainda não completamente desenvolvida (Figura 10). As plantas inoculadas foram cobertas com saco plástico (câmara-úmida) e mantidas no escuro por 48 h na temperatura de 24 °C. Após esse período, a câmara-úmida foi retirada e as plantas incubadas em câmara-de-crescimento sob fotoperíodo de 12 h ($800 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), umidade

relativa de 40-60% e temperatura constante de 24 °C (Bassanezi, 1995). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo cada repetição constituída de um vaso com duas plantas.

3.3 Regiões avaliadas das plantas e coleta de amostras

As amostras vegetais, correspondendo a um disco de folha com 2,1 cm de diâmetro (3,46 cm² de área), foram coletadas após o aparecimento dos sintomas. A coleta foi realizada no intervalo de tempo entre 1 e 6 h após o início do período luminoso da câmara-de-crescimento, de tal forma a se obter amostras com alta porcentagem de ativação da enzima rubisco, ou, amostras com baixa concentração de 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (inibidor da rubisco).

Durante o procedimento de amostragem, cada amostra coletada foi imediatamente acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada com nitrogênio líquido (N₂L), dispensando-se para isto, um tempo de no máximo 15 s entre a coleta e o congelamento. As amostras para determinação da atividade de rubisco foram armazenadas em botijão criogênico com N₂L até o momento do ensaio, enquanto que as amostras para determinação de teores de clorofila e de ergosterol e atividades de β -1,3 glucanase, quitinase e clorofilase foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Foram coletadas amostras nas segundas folhas trifolioladas inoculadas, bem como nas terceiras folhas trifolioladas não inoculadas de plantas infectadas, para ambos os patossistemas (Figura 10). Nas folhas inoculadas foram coletadas duas regiões, uma contendo baixa severidade (5-10% de área foliar ocupada por lesões ou pústulas) e outra com média severidade (25-30% de área ocupada por lesões ou pústulas). Na 3ª folha não inoculada de plantas doentes, foi amostrada apenas uma região, numa tentativa de se verificar possíveis alterações no metabolismo de outras partes da planta distantes do ponto de inoculação. Amostras correspondentes a estas foram coletadas também em plantas testemunha não inoculadas.

Figura 10 – Esquema de inoculação e coleta das amostras.

3.4 Quantificação de clorofila

Amostras coletadas e armazenadas conforme descrito no item 3.3 foram homogeneizadas em almofariz de porcelana com 2 ml de acetona 80% (v/v) à 4 °C e protegidas da luz, filtradas em papel de filtro Whatman nº 1 e o filtrado levado ao volume final de 5 ml com acetona 80%. Em seguida, foi realizada a leitura de absorbância do filtrado a 645 e 663 nm (Arnon, 1949).

A concentração de clorofila total foi calculada pela fórmula:

$$\text{mg clorofila total} / \text{AVR} = [20,2(A_{645}) + 8,02(A_{663})] \times V / (1000 \times \text{AVR}), \text{ onde:}$$

- A_{645} e A_{663} : absorbância a 645 e 663 nm;
- V: volume final do extrato (ml);
- AVR: área verde remanescente em cm^2 (= área total do disco de folha amostrado subtraído da área ocupada por lesões ou pústulas).

Também foi calculado:

$$\text{mg clorofila a / AVR} = [12,7(A_{663}) - 2,69(A_{645})] \times V / (1000 \times \text{AVR}) \quad \text{e}$$

$$\text{mg clorofila b / AVR} = [22,9(A_{645}) - 4,68(A_{663})] \times V / (1000 \times \text{AVR})$$

3.5 Atividade de clorofilase

3.5.1 Obtenção da preparação enzimática

Amostras coletadas e armazenadas, conforme descrito no item 3.3, foram homogeneizadas em almofariz de porcelana com 2 ml de acetona p.a. (a 4 °C). O sobrenadante contendo acetona e pigmentos foi retirado com pipeta Pasteur e o material sólido retido no almofariz foi lavado com mais 2 ml de acetona para remoção do excesso de pigmentos. O pó cetônico retido no almofariz foi seco a temperatura ambiente, pesado e armazenado em geladeira (Holden, 1961; Sabater & Rodriguez, 1978).

3.5.2 Preparo do substrato para clorofilase

Folhas de feijoeiro foram homogeneizadas em acetona p.a. (a 4 °C) (1 grama de peso fresco de folhas saudáveis para 4 ml de acetona), filtradas através de funil de Büchner com papel de filtro Whatman nº 1 e armazenadas a 4 °C por 3 dias. Os carotenóides precipitados durante o armazenamento foram removidos por filtração em papel Whatman nº 1. O filtrado assim obtido teve seu conteúdo de clorofila determinado conforme item 3.4, sendo então utilizado como substrato para a enzima clorofilase.

3.5.3 Determinação da atividade enzimática

Cerca de 5 mg de pó cetônico de cada amostra foram misturados com 0,8 ml de solução de clorofila (item 3.5.2) e 0,4 ml de solução de citrato de sódio (concentrações finais: acetona = 60%; citrato = 0,04 M), e incubados a 30 °C e escuro por 24 h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur e o material sólido retido no tubo de ensaio foi lavado com mais 1 ml de acetona para remoção completa dos pigmentos. Aos sobrenadantes reunidos foi adicionado 1 ml de NaCl 2% (peso/volume) para bloquear a atividade da enzima, e o volume foi levado a 3 ml com acetona 80%.

A atividade de clorofilase foi expressa em termos de unidade enzimática (U.E.) / g de pó cetônico (P.C.), onde 1 unidade é baseada na quebra de 10% do substrato a clorofilídeo em 1 hora nas condições experimentais.

3.6 Determinação da atividade de rubisco

3.6.1 Extração

Os procedimentos de extração e dosagem das atividades inicial e total da rubisco foram adaptadas dos trabalhos de Brestic et al. (1995), Butz & Sharkey (1989), Kobza & Seeman (1989), Sage et al. (1993) e Sharkey et al. (1986), através da taxa de incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ em produtos ácidos estáveis.

Amostras de tecido vegetal, obtidas conforme descrito no item 3.3, foram retiradas do envelope de papel alumínio e imediatamente colocadas em almofariz de porcelana contendo N_2L , sendo então homogeneizadas até a obtenção de um pó. A este material homogeneizado foi adicionado 1 ml de tampão de extração contendo: 100 mM de Tricine (pH 8,0); 20 mM de KCl; 0,4 mM de PMSF (fenilmetilsulfonil fluorido); 2,5 mM de EDTA; 0,8 mM de benzamidina; 4 mM de ácido amino-capróico; 5 mM de DTT. A suspensão obtida foi coletada com pipetador, acondicionada em tubo para microcentrifuga e armazenada em gelo.

O extrato foi utilizado para se determinar as atividades inicial (AI) e total (AT), bem como a porcentagem de ativação (%A) da rubisco. A atividade inicial reflete o atual nível de carboxilação ou competência catalítica da enzima, enquanto que a atividade total reflete o nível potencial de carboxilação da enzima. A porcentagem de ativação é calculada por: $\%A = [(AI) / (AT)] \times 100$.

3.6.2 Atividade inicial ou *in vivo*

Imediatamente após a obtenção do extrato, uma alíquota de 20 µl foi adicionada a 100 µl de TAI (tampão para atividade inicial) contendo: 100 mM de Tricine (pH 8,0); 0,6 mM de ribulose-1,5-bifosfato; 10 mM de NaHCO₃; 20 mM de MgCl₂; 4 mM de DTT; e NaH¹⁴CO₃ (7 µl ¹⁴C em 3,5 ml de TAI). Após 30 s a 25 °C, a reação foi paralisada com 200 µl de HCl 1M. A reação foi realizada em tubos para microcentrífuga. Para cada amostra foram preparadas duas réplicas (20 µl extrato + 100 µl TAI + 200 µl HCl) e um branco (100 µl TAI + 200 µl HCl).

3.6.3 Atividade total ou *in vitro*

Imediatamente após determinada a atividade inicial, procedia-se à determinação da sua atividade total. Para tanto, 20 µl do extrato foram misturados a 50 µl de tampão de ativação (TA), sendo essa mistura incubada em tubo para microcentrífuga durante 10 min a 25 °C. O TA continha: 100 mM de Tricine (pH 8,0); 20 mM de NaHCO₃; 40 mM de MgCl₂; 4 mM de DTT. Decorrido o tempo de ativação, 50 µl de TAT (tampão para atividade total) foram adicionados à mistura, a qual, após um tempo de reação de mais 30 s a 25 °C, recebeu 200 µl de HCL 1 M para paralisar a reação. O TAT continha: 100 mM de Tricine (pH 8,0); 1,2 mM de ribulose-1,5-bifosfato; 10 mM de NaHCO₃; 4 mM de DTT; e NaH¹⁴CO₃ (7 µl ¹⁴C em 3,5 ml de TAT). Para cada amostra foram preparadas duas réplicas (20 µl extrato + 50 µl TA + 50 µl TAT + 200 µl HCl) e um branco (50 µl TA + 50 µl TAT + 200 µl HCl).

Com o término das reações para se determinar as atividades inicial e total (sempre realizadas no interior de capela), as misturas no interior dos tubos para microcentrifuga foram transferidas individualmente para frascos de cintilação e evaporadas sob fluxo de ar por aproximadamente 2 horas. Após a evaporação, foram adicionados 2 ml de etanol + HCl (1:1, v/v) em cada frasco, os quais foram deixados para secar sob fluxo de ar por aproximadamente 12 h. Decorrido esse tempo, cada frasco recebeu 3 ml de líquido de cintilação, sendo realizada a seguir, as leituras de desintegrações por minuto (DPM) em cintilador (Tri-Carbi 1600 TR).

Em frascos de cintilação foram preparados dois brancos de TAI (50 µl TAI + 3 ml de líquido de cintilação) e dois de TAT (50 µl TAT + 3 ml de líquido de cintilação); os quais tiveram suas leituras de DPM determinadas.

Do extrato obtido de cada amostra, foi determinada também a quantidade de clorofila através do método de Porra et al. (1989): 50 µl amostra em tampão de extração + 950 µl acetona 80% tamponada (2,5 mM tampão fosfato de sódio pH 7,8). Após centrifugação a 5.000 g por 5 min, foi realizada a leitura de absorbância a 663,6 nm e 646,6 nm e o cálculo da concentração de clorofilas *a* + *b* (em µg/ml):

$$\text{Clorofilas } a + b = 17,76 (\text{Abs}_{646,6}) + 7,34 (\text{Abs}_{663,6})$$

No **Apêndice 1** encontram-se os procedimentos de preparo dos tampões de extração, TA, TAI e TAT.

3.7 Determinação da atividade de β-1,3 glucanase e quitinase

3.7.1 Extração de proteínas

Amostras de tecido vegetal obtidas conforme descrito no item 3.3 foram homogeneizadas em almofariz de porcelana na presença de 4,0 ml de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) (tampão de extração), com posterior

centrifugação (20.000 g, 25 min, 4 °C). Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar a atividade enzimática e o teor de proteínas. No **Apêndice 2** há um esquema para extração e dosagem das atividades enzimáticas.

3.7.2 Atividade de quitinase

A atividade de quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV” (Wirth & Wolf, 1990) de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (“CM-Chitin-RBV”). Para tanto, 200 µl do extrato proteico foram misturados com 600 µl do mesmo tampão de extração e 200 µl de “CM-Chitin-RBV” (2,0 mg/ml). Após incubação por 20 min a 40 °C, a reação foi paralizada com a adição de 200 µl de solução de HCl 1,0 M, seguida de centrifugação por 5 min a 5.000 g (4 °C). A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se na cubeta de referência: 800 µl de tampão de extração + 200 µl de “CM-Chitin-RBV” + 200 µl HCl (após incubação e centrifugação). Os resultados foram expressos em unidades enzimática (U.E.) / mg de proteína, onde 1 U.E. equivale à leitura de absorbância / minuto de incubação.

3.7.3 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase nas amostras foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido *p*-hydroxibenzóico (HAPHB) (Lever, 1972). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 1 h, continha 50 µl do tampão de extração, 200 µl do extrato proteico e 250 µl de laminarina (4,0 mg/ml) (Abeles & Forrence, 1970). Após esse período, foram acrescentados 1,5 ml de uma solução de HAPHB (0,5 g dissolvido em 10 ml de HCl 0,5 M, acrescido de 40 ml de NaOH 0,5 M), sendo em seguida essa mistura aquecida a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em gelo até a temperatura de 30 °C, as amostras tiveram a absorbância determinada a 410 nm, contra tampão de extração (Vogelsang &

Barz, 1993). Subtraiu-se de cada amostra o valor do controle (esse controle correspondia a uma mistura idêntica à da amostra, mas sem incubação prévia). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose (**Apêndice 3**) e os resultados expressos em katal (kat) / mg de proteína, onde 1 kat foi definido como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mol equivalente de glicose / segundo de incubação, sob as condições experimentais.

3.8 Quantificação de ergosterol nos tecidos vegetais

O método para a quantificação do ergosterol foi baseado nos trabalhos de Griffiths et al. (1985), com algumas modificações (Stangarlin, 1995). Amostras de tecido vegetal, obtidas conforme descrito em 3.3, foram homogeneizadas em 5,0 ml de acetona p.a. (4 °C) e filtradas em papel de filtro Whatman nº 1. Logo após, o resíduo no papel de filtro foi lavado novamente com mais 5,0 ml de acetona. Esse papel de filtro contendo o resíduo dos tecidos vegetais foi deixado secar à temperatura ambiente por alguns minutos (para a evaporação da acetona). O resíduo, representando o pó cetônico, foi colocado em tubo de ensaio onde foram adicionados 4 ml de etanol 95% a 4 °C e aproximadamente 10 mg de ácido pirogálico. O material foi deixado em condição de geladeira por 1 h, quando então adicionou-se 0,8 ml de KOH 60% (peso/volume) para se realizar a saponificação a 90 °C por 30 min. O material saponificado recebeu 2,0 ml de água destilada, sendo então particionado duas vezes com hexana. As frações de hexana foram evaporadas a 70 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 1,0 ml de metanol p.a. e filtrado em filtro descartável para seringa (0,45 µm de diâmetro de póro). Estes extratos metanólicos foram analisados através de cromatografia líquida de alta pressão ("HPLC") usando-se coluna Supelcosil LC-18 (25,0 cm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 ml de etanol p.a./min. O tempo de retenção do ergosterol, com base na

absorbância a 282 nm, foi de aproximadamente 7,9 min. O esquema de extração está representado no **Apêndice 4**.

Os valores obtidos foram plotados em curva padrão para ergosterol p.a. (**Apêndice 5**), e comparados com valores de ergosterol para a cultura pura do fungo *P. griseola* ou urediniósporos de *U. appendiculatus* (curva com 0, 1, 5 e 10 mg de peso seco de micélio ou de urediniósporos, respectivamente). O micélio de *P. griseola* foi obtido a partir de cultura do patógeno crescido em meio líquido de suco de tomate, sob escuro, sem agitação e temperatura de 24 °C. Após 25 dias, o micélio produzido foi seco em estufa a 50 °C até peso constante. Os urediniósporos de *U. appendiculatus* foram obtidos conforme descrito em 3.2.1.

3.9 Determinação do conteúdo total de proteínas

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas. Para tanto foram adicionados, sob agitação, 0,2 ml de reagente de Bradford concentrado a cada 0,8 ml de amostra. Após 5 min, foi realizada a leitura de absorbância a 595 nm.

A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) (µg proteína / ml) foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 µg / ml (**Apêndice 6**).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teor de clorofila e atividade de clorofilase no patossistema feijoeiro

- *P. griseola* (mancha angular)

Os sintomas de lesões necróticas e angulares nas folhas de feijoeiro, de ambas as cultivares Carioca e Rosinha, só foram observados 10 dias após a inoculação. Decorridos mais 2 dias (12º dia após a inoculação), com o completo desenvolvimento dos sintomas, foram coletadas as amostras para a análise do conteúdo de clorofila e atividade de clorofilase, bem como para as demais determinações. O conjunto de amostras coletadas na 2ª folha trifoliolada inoculada, permitiu a separação das mesmas nas categorias de baixa (5-10% de área lesionada) e média (25-30% de área lesionada) severidade.

4.1.1 Cultivar Carioca

Os teores de clorofilas *a*, *b* e total, bem como a atividade de clorofilase para a cultivar Carioca, moderadamente suscetível ao patógeno hemibiotrófico *P. griseola*, estão representados na **Figura 11**.

A quantidade de clorofila *a* (Figura 11A) em regiões de baixa e média severidade de folhas inoculadas foi 12% e 23% menor, respectivamente, em relação ao controle, embora a única diferença significativa tenha ocorrido para a região de média severidade. Na 3ª folha trifoliolada não inoculada, mas de planta infectada, não houve redução na concentração de clorofila *a*.

Para clorofila *b* (Figura 11B) houve decréscimos de 10% e 22% em áreas com baixa e média severidade, respectivamente, com diferença significativa apenas para esta última região amostrada. Não ocorreu alteração no teor desse pigmento na 3ª folha trifoliolada não inoculada.

O teor de clorofila total (Figura 11C) expressa de forma geral os resultados observados com as clorofilas *a* e *b*, indicando redução na concentração desses pigmentos apenas em áreas verdes próximas às regiões infectadas com o patógeno, principalmente em áreas com média severidade.

Os valores obtidos para a atividade de clorofilase (Figura 11D) estão de acordo com os resultados comentados anteriormente, observando-se maior atividade enzimática nas regiões infectadas com o patógeno, ou seja, regiões que apresentam menores teores de clorofila por unidade de área verde remanescente. Nessas regiões de baixa e média severidade a atividade foi 55% e 122% maior, respectivamente, em relação à testemunha. Não houve diferença significativa em relação ao controle para a 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta infectada.

4.1.2 Cultivar Rosinha

Para a cultivar Rosinha, altamente suscetível a *P. griseola*, os resultados do conteúdo de clorofilas *a*, *b* e total e da atividade de clorofilase estão representados na **Figura 12**.

Os teores de clorofilas *a* e *b* (Figuras 12A e 12B, respectivamente) não diferiram significativamente do controle tanto para regiões de baixa quanto média severidade em folhas inoculadas. Reduções significativas de 10% para a clorofila *a* e de 10,5% para a clorofila *b* ocorreram somente na 3ª folha trifoliolada, não inoculada, de planta infectada. O conteúdo de clorofila total (Figura 12C) indica esse comportamento de redução nos teores desses pigmentos apenas em áreas verdes distantes do local de infecção.

A atividade de clorofilase (Figura 12D) está em conformidade com os resultados observados, verificando-se maior atividade enzimática na região não infectada pelo patógeno, ou seja, região que neste caso, apresenta menores teores de clorofila por unidade de área verde. Nessa região, a atividade da enzima é 56% maior em relação ao controle.

4.1.3 Discussão

Conforme mostrado, na cultivar Carioca houve redução na concentração de clorofilas apenas nas áreas verdes próximas às regiões infectadas com *P. griseola*, enquanto que na cultivar Rosinha, a redução ocorreu apenas à distância do local de infecção. Isto pode ser observado na **Figura 13**, onde a presença de clorose, próximas às lesões necróticas causadas pelo patógeno, é notada apenas na cultivar Carioca (Figura 13A). Embora tenha havido redução no conteúdo de clorofila na 3ª folha trifoliolada, não inoculada, de plantas infectadas da cultivar Rosinha, não foi possível, visualmente, observar a ocorrência de clorose.

A relação direta entre a menor concentração de clorofilas e a maior atividade de clorofilase, observado para ambas as cultivares, indica que a redução no teor desses pigmentos verdes provavelmente ocorre em função da lise enzimática, e não pela supressão da sua síntese. A proporção entre clorofilas *a* e *b* (**Tabela 1**) mantém-se constante para as diferentes regiões amostradas das duas cultivares, indicando que ambas as clorofilas são igualmente degradadas pela enzima, mesmo em áreas de maior atividade enzimática. No caso da cultivar Carioca, a infecção por *P. griseola* poderia estar causando um dano estrutural nos cloroplastos, permitindo o contato entre enzima e substrato (clorofila), resultando em sintomas de clorose próximos às lesões necróticas. Com relação à cultivar Rosinha, o padrão de perda de clorofila apenas à distância do local de infecção sugere a ação de algum fator adicional.

Há poucos trabalhos na literatura mostrando o efeito da infecção por patógenos hemibiotróficos sobre o conteúdo de clorofila e/ou atividade de clorofilase. Isto pode ser pelo fato de que a infecção por esses patógenos, de forma geral, ocorre através de moderada atividade de enzimas hidrolíticas e produção de metabólitos tóxicos, estes últimos com um sugestivo efeito direto sobre os cloroplastos, conduzindo ao sintoma de clorose (Goodman et al., 1986; Pascholati et al., 1998). Porém, como se pôde observar através deste trabalho, mesmo considerando-se um único patossistema, feijoeiro - *P. griseola* ou feijoeiro - *U. appendiculatus* (este será visto adiante), diferentes comportamentos com relação ao conteúdo de clorofila podem ser obtidos dependendo da cultivar em questão, comportamentos estes nem sempre previsíveis. Considerando-se apenas o nível de resistência dos genótipos de feijoeiro aqui utilizados, poderia-se esperar maior redução no conteúdo de clorofila, em áreas próximas às lesões, na cultivar Rosinha que é altamente suscetível à *P. griseola*, e não na cultivar Carioca, a qual é moderadamente suscetível ao patógeno.

Doenças causadas por fungos e que resultam em sintomas de necrose parecem influenciar o processo fotossintético por afetar, inicialmente, os cloroplastos. Assim, a degeneração de cloroplastos, resultando em perdas no conteúdo de clorofila e em redução na fixação de CO₂ é o sintoma primário para muitas doenças, particularmente aquelas originadas da infecção por parasitas facultativos (ou hemibiotróficos) (Goodman et al., 1986).

Hodges & Coleman (1984) trabalhando com folhas de *Poa pratensis* infectadas pelo hemibiotrófico *Bipolaris sorokiniana*, verificaram que além da formação de lesões necróticas circundadas por halos cloróticos, havia também a presença de clorose internerval, interligando lesões individuais, e que evoluía para uma completa clorose de todos os tecidos não diretamente afetados pelas lesões. Nestes tecidos, a perda de clorofila foi de 44% em relação ao controle. Aspectos com relação à atividade de clorofilase ou a

fixação de CO₂ não foram comentados pelos autores. Posteriormente, em pesquisas com o mesmo patossistema acima, Hodges (1990) e Hodges & Campbell (1993) determinaram que a produção de etileno, hormônio vegetal gasoso e móvel na planta, era um componente da patogênese que contribuía para o incremento dos sintomas de clorose nas folhas infectadas, embora a formação de halos cloróticos ao redor das lesões não estivesse em função do aumento na produção desse gás. Dessa forma, esses pesquisadores concluíram que o etileno poderia estar atuando à distância dos locais de infecção, auxiliando na manifestação dos sintomas de clorose, enquanto que os halos cloróticos poderiam estar sendo formados em resposta a uma fitotoxina produzida pelo patógeno.

Exemplos de trabalhos com fitopatógenos bacterianos e seus efeitos diretos sobre o conteúdo de clorofila também podem ser citados. Guyla & Dunleavy (1979) verificaram uma perda de 35% na quantidade de clorofila em cotilédones de soja infectados com *Pseudomonas glycinea*. Análises do teor de ácido aminolevulínico, um precursor na síntese de clorofila, indicaram redução na concentração dessa substância. Esse fato, associado à ausência de alteração na relação clorofilas *a/b*, sugere que a clorose induzida pela bactéria é devido, provavelmente, à supressão da síntese desse pigmento e não à degradação. Esses autores também mostraram que sintomas de clorose sistêmica podiam ser observados na primeira e segunda folhas trifolioladas, e em menor extensão na terceira folha trifoliolada, quando as folhas primárias ou unifolioladas recebiam a infiltração de uma solução contendo a toxina purificada do patógeno. Nema (1991) trabalhando com folhas de bétula (uma piperácea) encontraram decréscimos no conteúdo de clorofila total, bem como de clorofilas *a* e *b*, em folhas infectadas com *Xanthomonas campestris* pv. *beticola*. Esses decréscimos foram mais acentuados na cultivar altamente suscetível (57%, 68% e 62% para clorofilas *a*, *b* e total, respectivamente); intermediários para a cultivar moderadamente suscetível (48%, 51% e 50%,

respectivamente, conforme ordem acima) e menores para a cultivar resistente (22%, 46% e 31%, respectivamente).

4.2 Teor de clorofila e atividade de clorofilase no patossistema feijoeiro - *U. appendiculatus* (ferrugem)

Cinco dias após a inoculação, sintomas de *flecks*, que são pequenas lesões amarelo-esbranquiçadas presentes nos locais de infecção pelo patógeno, já podiam ser observados em folhas de feijoeiro de ambas as cultivares Carioca e Rosinha. No 7º dia após a inoculação, com a passagem dos sintomas do estágio de *flecks* para o estágio de pústulas esporulantes, foram coletadas as amostras para a análise do conteúdo de clorofila e atividade de clorofilase, bem como para as demais determinações. O conjunto de amostras coletadas na 2ª folha trifoliolada inoculada, permitiu a separação das mesmas nas categorias de baixa (5-10% de área lesionada) e média (25-30% de área lesionada) severidade.

4.2.1 Cultivar Carioca

Os teores de clorofilas *a*, *b* e total, e também a atividade de clorofilase para a cultivar Carioca, moderadamente suscetível ao biotrófico *U. appendiculatus*, estão representados na **Figura 14**.

Em relação ao controle, a quantidade de clorofila *a* (Figura 14A) foi 7% e 25% maior, em regiões de baixa e média severidade de folhas inoculadas, respectivamente, embora a única diferença significativa tenha ocorrido para a região de média severidade. Por outro lado, na 3ª folha trifoliolada não inoculada, mas de planta infectada, houve uma redução significativa de 18% no teor dessa clorofila.

Para a clorofila *b* (Figura 14B) ocorreram aumentos significativos de 15% e 25% para regiões com baixa e média severidade, respectivamente. Da mesma forma que para a clorofila *a*, aqui também se observou uma redução

no teor de clorofila *b* na ordem de 20% para a 3ª folha trifoliolada não inoculada.

O teor de clorofila total (Figura 14C) expressa os resultados observados com as clorofilas *a* e *b*, podendo-se notar incrementos de 6% e 22% para regiões com baixa e média severidade respectivamente, e decréscimo de 17% em áreas verdes distantes do local de infecção.

Com relação à atividade de clorofilase (Figura 14D), embora não diferindo estatisticamente, os resultados estão de acordo com aqueles acima descritos, observando-se menor e maior valor de atividade enzimática para regiões com mais ou menos clorofila, respectivamente. Nas regiões infectadas, a atividade foi em torno de 17% menor em relação ao controle, enquanto que à distância da folha infectada a atividade foi 76% maior.

4.2.2 Cultivar Rosinha

Os resultados da quantidade de clorofilas *a*, *b* e total e da atividade de clorofilase na cultivar Rosinha, altamente suscetível a *U. appendiculatus*, estão representados na **Figura 15**.

Houve incrementos no teor de clorofila *a* (Figura 15A) tanto em áreas infectadas pelo patógeno, quanto em áreas distantes do local de infecção. Na área infectada pelo patógeno, incremento significativo, em torno de 13%, ocorreu apenas sob média severidade de doença. Na 3ª folha trifoliolada não inoculada o incremento foi de 8%.

A quantidade de clorofila *b* (Figura 15B) aumentou em áreas com média severidade de doença e também em áreas distantes do local de infecção, com valores de 18% e 19%, respectivamente. Esses incrementos foram maiores quando comparados aos obtidos para a clorofila *a* nas mesmas regiões amostradas.

Os resultados de clorofila total (Figura 15C) indicam esse comportamento de aumento na concentração de pigmentos tanto em regiões de

média severidade da folha inoculada (12%), quanto na 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente (11% de incremento).

A atividade de clorofilase (Figura 15D) está em conformidade com os resultados acima descritos. Em regiões de média severidade de folha inoculada e na 3ª folha trifoliolada não inoculada, a atividade da enzima foi 68% e 36% menor, respectivamente, em relação aos controles. Embora não tenha ocorrido incremento no teor de clorofila em regiões infectadas e exibindo baixa severidade de doença, a atividade de clorofilase foi 64% menor em relação ao respectivo controle.

4.2.3 Discussão

Conforme descrito anteriormente, na cultivar Carioca, moderadamente suscetível, houve incrementos na concentração de clorofilas apenas nas áreas verdes próximas às regiões infectadas com *U. appendiculatus*, e um decréscimo na 3ª folha trifoliolada, ou seja, à distância do local de infecção. Na cultivar Rosinha, altamente suscetível ao patógeno, não foram observadas reduções nos teores de clorofilas, mas apenas incrementos que ocorreram tanto em regiões inoculadas e exibindo média severidade, quanto em regiões distantes e não infectadas.

O incremento no teor de clorofila que ocorre nas regiões infectadas para ambos os materiais mostrou-se pelo menos duas vezes maior na cultivar Carioca em relação à cultivar Rosinha. Isto pode ser visualmente observado na **Figura 16**, onde se nota a presença de halos cloróticos mais acentuados e definidos ao redor das pústulas da cultivar Rosinha (Figura 16B), onde portanto, estaria havendo menor incremento no teor de clorofila ou menor retenção desse pigmento. Apesar de ter havido decréscimo no conteúdo de clorofila na 3ª folha trifoliolada não inoculada da cultivar Carioca, visualmente não foi possível verificar a presença de clorose generalizada nesta região.

Na possibilidade do incremento de clorofila em áreas infectadas ser devido à retenção desse pigmento, a menor relação entre clorofilas *a/b* (**Tabela 2**), observada para a região de baixa severidade das cultivares Carioca e Rosinha e para a 3ª folha trifoliolada de planta infectada da cultivar Rosinha, estaria indicando maior retenção nos teores de clorofila *b* em comparação com a clorofila *a*. De uma maneira oposta à retenção de pigmento, Scholes & Farrar (1985) verificaram que em folhas da ornamental jacinto infectadas com *U. muscari*, a taxa de clorofilas *a/b* era reduzida em tecidos doentes, enquanto que a concentração de carotenóides permanecia relativamente alta. Os autores sugerem que embora alguns dos complexos de coleta de luz tenham sido perdidos, uma maior proporção de clorofila *a* deve ter sido degradada no fotossistema II, resultando em redução na taxa de fotofosforilação não-cíclica.

Em doenças causadas por patógenos biotróficos, mais precisamente doenças do tipo ferrugem, tem-se reportado que em estádios iniciais da infecção, a fotossíntese permanece praticamente inalterada e mesmo um acréscimo no nível de clorofila pode ocorrer (Livne, 1964). Em folhas de feijoeiro infectadas com *U. phaseoli* foram detectados incrementos de até 20% nos níveis de clorofila, incrementos estes que se mantiveram desde o início do aparecimento dos sintomas (*flecks* cloróticos) até o completo desenvolvimento das pústulas, ou seja, no estágio de esporulação do patógeno aos 7-8 dias após a inoculação (Sziráki et al., 1984). Os mesmos autores também verificaram que este aumento no teor de clorofila podia se manter por até 11-13 dias após a infecção, quando o sintoma de ilhas verdes tornava-se visível. Nos trabalhos com as cultivares Carioca e Rosinha, embora os experimentos não tenham sido conduzidos até o estágio de formação de ilhas verdes, incrementos nos teores de clorofila, em torno de 20% nos tecidos infectados, também foram observados. A menor atividade de clorofilase nestes tecidos indica que pode estar havendo uma manutenção no nível desses

pigmentos. Wang (1961) constatou que o incremento de até 30% no conteúdo de clorofila, em folhas de feijoeiro infectadas com *U. phaseoli*, ocorria na periferia das colônias do patógeno e que o sintoma de ilhas verdes era resultado da retenção de pigmento nos tecidos do hospedeiro dentro do domínio de influência do parasita. Esse pesquisador mostrou que quando as plantas eram mantidas sob baixa intensidade luminosa, para indução da formação de ilhas verdes, tanto as folhas sadias quanto as doentes apresentavam, no início, uma mesma taxa de perda de clorofila. Posteriormente, o conteúdo de pigmentos decrescia rapidamente nos tecidos não infectados, enquanto que nas áreas doentes, ao redor das pústulas, permanecia a um nível mais ou menos constante.

Patossistemas envolvendo outros fungos biotróficos, como os causadores de míldio e oídio, podem mostrar resultados diferentes daqueles até agora comentados para as ferrugens. Folhas de pepino infectadas com *S. fuliginea* exibem perdas de até 50% no conteúdo de clorofila em comparação com tecidos não infectados (Abo-Foul et al., 1996). Nenhum aspecto sobre a atividade de clorofilase é comentado. Além da perda de clorofila, reduzindo a capacidade de absorção de luz, os autores também verificaram danos aos tilacóides e perda de estroma dos cloroplastos.

4.3 Atividade de rubisco no patossistema feijoeiro – *P. griseola* (mancha angular)

4.3.1 Cultivar Carioca

Os valores da atividade inicial, atividade total e porcentagem de ativação da rubisco estão representados na **Figura 17**.

A atividade inicial ou *in vivo* (Figura 17A) foi 10% e 23% menor em relação ao controle para regiões de baixa e média severidade, respectivamente. No entanto, à distância do local de infecção, ou seja, na 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente, a atividade foi

acentuadamente incrementada, atingindo um valor 139% maior que o encontrado para plantas sadias.

Os valores de atividade total ou *in vitro* (Figura 17B) seguem a mesma tendência da atividade *in vivo*, com reduções de 12% e 32% para regiões de baixa e média severidade, respectivamente, e incremento de 80% à distância da folha infectada.

Com relação à porcentagem de ativação (Figura 17C), a única diferença significativa observada foi para a 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente, com um valor 21% maior em relação ao controle.

4.3.2 Cultivar Rosinha

Os valores das atividades inicial e total e porcentagem de ativação da rubisco para a cultivar Rosinha, estão representados na **Figura 18**. O conjunto de amostras coletadas para estas determinações permitiu a separação das mesmas nas categorias de severidade: baixa (5-10% de área lesionada), média (25-30%) e alta (40-45%), todas obtidas na 2ª folha trifoliolada inoculada.

A infecção com *P. griseola* causou reduções na atividade inicial da rubisco (Figura 18A) na ordem de 24%, 33% e 46% para regiões com baixa, média e alta severidade, respectivamente. Da mesma forma, houve uma redução de 33% na atividade para a 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente.

A atividade total (Figura 18B) apresentou o mesmo comportamento verificado com a atividade inicial, com reduções de 26%, 20% e 46% para regiões com baixa, média e alta severidade, respectivamente, e redução de 27% para a 3ª folha trifoliolada não inoculada.

Com relação à porcentagem de ativação (Figura 18C), foram observados decréscimos de 8% e 17% para regiões com baixa e média severidade, respectivamente, e de 16% à distância da folha infectada.

4.3.3 Discussão

Conforme demonstrado anteriormente, a cultivar Carioca, moderadamente suscetível ao hemibiotrófico *P. griseola*, apresentou reduções nas atividades inicial e total da rubisco em regiões infectadas com o patógeno (regiões onde houve perdas no conteúdo de clorofila – item 4.1.1). Em regiões não infectadas, ou seja, na folha acima daquela inoculada (região sem alteração no nível de clorofila), as atividades inicial e total, bem como a porcentagem de ativação foram incrementadas. Estes incrementos em folhas não inoculadas de plantas doentes estariam sugerindo a presença de um mecanismo atuando em regiões distantes do local de infecção e que poderia estar compensando as reduções nas atividades da rubisco observadas para áreas colonizadas ou dentro do domínio de influência do patógeno, ou seja, aqueles tecidos localizados ao redor das lesões necróticas.

Com relação à cultivar Rosinha, altamente suscetível ao patógeno, os efeitos sobre a atividade da rubisco foram mais prejudiciais, com reduções observadas tanto em áreas colonizadas (região sem alterações no teor de clorofilas – item 4.1.2) quanto à distância do local de infecção (região com redução nos níveis de clorofilas).

O possível efeito compensatório verificado para a 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente da cultivar Carioca, caso resulte em um aumento na quantidade de fotoassimilados produzidos, não indicará necessariamente, um efeito benéfico para a planta, ou seja, um efeito que pudesse de alguma forma garantir a manutenção da produção vegetal mesmo diante de um certo nível de infecção do patógeno. Já foi verificado para infecções com biotróficos que o estímulo da fixação de CO₂ em folhas não infectadas de plantas doentes poderia ser uma fonte de carboidratos para a folha colonizada. A translocação seria direcionada de tecidos ou folhas não infectadas para aquelas infectadas, enquanto que a exportação de nutrientes a partir destas últimas seria grandemente reprimida (Livne & Daly, 1966; Pozsár

& Király, 1966). A competição por metabólitos entre tecidos normais ou sadios do hospedeiro e tecidos parasitados é que pode determinar a extensão final dos danos devido à doença.

A assimilação de CO₂ em patossistemas pode ser incrementada ou sofrer decréscimos dependendo do tempo após a infecção ou mesmo do tecido amostrado. Áreas de tecido vegetal que permanecem verdes e não infectadas podem ter um estímulo na taxa de assimilação de CO₂, geralmente associadas à mudanças na atividade de enzimas envolvidas na fotossíntese, compensando parcialmente a redução que ocorre nos tecidos infectados (Goodman et al., 1986). Entretanto, até o momento esse fenômeno só havia sido descrito para interações com patógenos biotróficos (como será visto adiante em 4.4.3). Para patógenos hemibiotróficos, como os exemplos que serão vistos a seguir, tem-se apenas verificado efeitos deletérios sobre o aparato fotossintético, tanto à nível de estudos bioquímicos quanto fisiológicos.

Kombrink & Hahlbrock (1990) verificaram que tanto a infecção por *P. infestans* em batata, quanto o tratamento com preparação elicitora obtida do fungo, ocasionava redução nos níveis de mRNA que codifica as subunidades pequenas da rubisco, bem como uma redução nos níveis da enzima. Essas reduções ocorriam devido à rápida e sistêmica repressão gênica que podia ser observada tanto em interações hospedeiro-patógeno compatíveis quanto incompatíveis. O efeito sistêmico foi estudado pelos autores apenas nas áreas verdes remanescentes das folhas infectadas, não havendo nenhuma informação a esse respeito para folhas distantes daquela inoculada.

A infecção por *S. sclerotiorum* em girassol permite a obtenção de resultados semelhantes aos mencionados para o patossistema *P. infestans* – batata. Ocorre um acentuado decréscimo nos níveis de mRNA que codifica as subunidades pequenas da rubisco, tanto em variedades tolerantes quanto em variedades suscetíveis ao patógeno. Nestas últimas, a redução é observada 2

dias após a infecção, enquanto que nas tolerantes somente após 8 dias (Mouly et al., 1988).

O trabalho de Pennypacker et al. (1990) com o patossistema *V. albo-atrum* e alfafa é outro exemplo onde se pode observar o efeito prejudicial do patógeno sobre a fotossíntese de folhas infectadas. A magnitude desse efeito depende do nível de resistência do hospedeiro. Esses pesquisadores encontraram uma redução significativa de 65% na atividade total da rubisco para clones de alfafa suscetíveis, enquanto que para clones resistentes não houve nenhuma variação significativa na atividade da enzima. A taxa fotossintética seguiu essa mesma tendência, com reduções para o material suscetível e ausência de alteração para o material resistente.

À nível fisiológico, Garry et al. (1998) estudaram o efeito da infecção com *Mycosphaerella pinodes* sobre a taxa fotossintética de plantas de ervilha cultivadas em casa-de-vegetação. Esses pesquisadores encontraram reduções de 53-56% e de 92-98% na fotossíntese de discos foliares apresentando 10-15% ou 35-40% de área coberta por lesões necróticas, respectivamente. Discos foliares com mais de 40% de área foliar lesionada apresentaram inibição total da taxa fotossintética. O decréscimo na fotossíntese não foi diretamente proporcional à fração de área necrótica da folha infectada, obtendo-se reduções maiores do que a redução da área foliar sadia. Esse resultado indica que está havendo um efeito negativo sobre a eficiência fotossintética da área verde remanescente e sem sintomas. Decréscimos na fotossíntese proporcionalmente maiores do que a fração de área necrótica já foram observados também por Bastiaans (1991) em folhas de arroz infectadas com *Pyricularia oryzae* e de feijoeiro infectadas com *C. lindemuthianum* (Bassanezi et al., 1997).

4.4 Atividade de rubisco no patossistema feijoeiro - *U. appendiculatus* (ferrugem)

4.4.1 Cultivar Carioca

Os resultados da atividade inicial, atividade total e porcentagem de ativação da rubisco para a cultivar Carioca, estão representados na **Figura 19**.

A atividade inicial (Figura 19A) foi 27% menor em relação ao controle para regiões infectadas e apresentando média severidade de doença. Redução de 12% também foi verificada na 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente.

Os valores de atividade total (Figura 19B) apresentaram resultados opostos aos observados para a atividade inicial, com incrementos de 10% em regiões exibindo baixa severidade e de 12% em áreas distantes da folha infectada.

Com relação à porcentagem de ativação (Figura 19C), foram encontradas reduções de 26% em áreas com média severidade de doença e de 21% na 3ª folha trifoliolada não inoculada.

4.4.2 Cultivar Rosinha

Os valores de atividades inicial e total, bem como da porcentagem de ativação da rubisco para a cultivar Rosinha, estão representados na **Figura 20**.

A infecção com *U. appendiculatus* ocasionou incrementos na atividade inicial da rubisco (Figura 20A) na ordem de 17% para regiões com média severidade de doença, e de 18% para a 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente.

Não se observaram alterações significativas nos valores de atividade total (Figura 20B) tanto para regiões obtidas de folhas infectadas e

apresentando baixa e média severidade, quanto para aquelas obtidas de folhas não inoculadas de plantas doentes.

A porcentagem de ativação (Figura 20C) foi 23% e 19% maior que o controle para regiões com baixa e média severidade, respectivamente. Da mesma forma, houve um incremento de 20% na ativação para a 3ª folha trifoliolada não inoculada.

4.4.3 Discussão

Conforme demonstrado anteriormente, a cultivar Carioca, moderadamente suscetível ao biotrófico *U. appendiculatus*, apresentou incrementos nos valores de atividade total da rubisco, tanto em regiões infectadas quanto na 3ª folha trifoliolada não inoculada. No entanto, a atividade inicial, e consequentemente a porcentagem de ativação, foram reduzidas em ambas as folhas.

Essas regiões da folha inoculada da cultivar Carioca onde a atividade inicial foi reduzida apresentaram, por outro lado, um incremento no teor de clorofilas (item 4.2.1). Dessa forma, a inibição da atividade *in vivo* da rubisco nessas regiões não parece estar sendo diretamente relacionada à perda desse pigmento. Provavelmente algum outro tipo de dano possa estar envolvido nessa inibição, como por exemplo, redução na abertura dos estômatos e dificuldade de difusão de CO₂ através do mesófilo foliar (Gordon & Duniway, 1982), ou mesmo algum tipo de lesão bioquímica. No caso da 3ª folha trifoliolada não inoculada, a redução na atividade inicial da rubisco pode estar relacionada à perda de clorofila observada para esses tecidos.

Com relação à cultivar Rosinha, altamente suscetível ao patógeno, foram obtidos resultados opostos aos da cultivar Carioca, havendo incrementos na atividade inicial e porcentagem de ativação da rubisco tanto em regiões infectadas quanto na 3ª folha trifoliolada não inoculada. No entanto, a atividade total manteve-se inalterada para ambas as folhas analisadas. Todas

essas regiões amostradas apresentaram incrementos no teor de clorofila (item 4.2.2).

As reações de redução do carbono são, de forma geral, prejudicadas em plantas infectadas por fungos. No entanto, doenças do tipo ferrugem parecem ser uma exceção, podendo haver incremento na fixação de CO₂ em estágios iniciais da doença (Goodman et al., 1986). Livne (1964) estudando o efeito da infecção com *U. phaseoli* var. *typica* em feijoeiro, através da incorporação de ¹⁴CO₂ durante a fotossíntese, verificou que folhas primárias, que possuíam uma baixa intensidade de infecção, apresentavam um estímulo na taxa de fotossíntese durante o aparecimento dos sintomas de *flecks*, a qual posteriormente, declinava para valores 70% menores em relação ao controle. Para folhas primárias com alta intensidade de infecção, nenhum estímulo foi observado e inclusive havia uma abrupta queda na fixação de ¹⁴CO₂ após a esporulação do patógeno. Outro efeito verificado pelo autor foi o estímulo na incorporação de ¹⁴CO₂ que ocorria para a primeira folha trifoliolada não inoculada de planta doente. A extensão desse estímulo parecia estar relacionada com a intensidade de infecção das folhas primárias inoculadas. Foi sugerido que a inibição da fotossíntese em tecidos infectados poderia estar sendo compensada, pelo menos parcialmente, pelo seu estímulo em folhas distantes daquela inoculada. Com relação às cultivares Carioca e Rosinha infectadas com *U. appendiculatus*, esse efeito compensatório parece não estar ocorrendo: na primeira houve redução da atividade *in vivo* da rubisco em folhas inoculada e não inoculada; na segunda, houve incremento em ambas as folhas.

So & Thrower (1976) observaram que em plantas de *Vigna sesquipedalis*, quando a segunda folha trifoliolada apresentava um baixo nível de infecção (20 colônias/cm²) com *U. appendiculatus*, havia um incremento de 9-18% na taxa fotossintética da terceira folha trifoliolada não inoculada. Por outro lado, na folha infectada, a fotossíntese era reduzida em torno de 15%. Esse incremento na fotossíntese observado para a folha de *V. sesquipedalis*

não infectada, foi semelhante ao incremento na atividade inicial da rubisco verificado para a 3ª folha trifoliolada não inoculada da cultivar Rosinha. Walter & Ayres (1983) também encontraram um estímulo na taxa fotossintética, acompanhada por incrementos na quantidade e atividade da rubisco, em folhas de cevada não infectadas, mas pertencentes a plantas cujas folhas inferiores haviam sido inoculadas com *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. O mesmo foi verificado por Roberts & Walters (1988) no patossistema alho-porró – *Puccinia allii*.

Resultados semelhantes aos acima descritos também já foram encontrados por Scholes & Farrar (1986) e Murray & Walters (1992) em plantas de *Vicia faba* infectadas com *U. viciae-fabae*. Estes últimos autores verificaram que a fotossíntese foi reduzida em 32% nas folhas inferiores inoculadas, enquanto que nas folhas superiores não infectadas da mesma planta, houve um incremento de até três vezes em relação ao controle. Essas folhas que apresentaram estímulo da taxa fotossintética adquiriram também um aumento na resistência à infecção, exibindo menor número de pústulas/cm² quando posteriormente inoculadas com o patógeno.

O incremento verificado na atividade *in vivo* da rubisco para a cultivar Rosinha, que ocorre tanto para a folha inoculada quanto para a folha acima não infectada, poderá estar resultando em benefícios ao patógeno. Livne & Daly (1966) observaram os fenômenos de “folhas fonte” e “folhas dreno” com relação ao movimento de substâncias fotossintetizadas em plantas de feijoeiro infectadas com *U. phaseoli* var. *typica*. Quando ¹⁴CO₂ era fornecido à primeira folha trifoliolada de plantas sadias, o ¹⁴C era transportado para as hastes, raízes e folhas trifolioladas mais jovens, e pouco ou quase nada se movia para folhas unifolioladas ou primárias. No entanto, quando apenas a folha primária era inoculada com o patógeno e o ¹⁴CO₂ fornecido à primeira folha trifoliolada, havia um significativo incremento no movimento de ¹⁴C em direção à folha infectada. So & Thrower (1976) também verificaram que colônias esporulantes

de *U. appendiculatus* eram os principais locais de acúmulo de fotossintetizados produzidos por folhas de *V. sesquipedalis*. Padrão de translocação semelhante foi encontrado por Owerá et al. (1983) em folhas de cevada infectadas com *P. hordei*.

4.5 Atividades de β -1,3 glucanase e quitinase

4.5.1 Patossistema feijoeiro – *P. griseola* (mancha agular)

Os resultados da atividade de β -1,3 glucanase para as cultivares Carioca e Rosinha estão representados na **Figura 21**. Para a cultivar Carioca (Figura 21A) não foram observadas diferenças significativas na atividade enzimática, tanto em regiões infectadas pelo patógeno quanto à distância do local de infecção (na 3ª folha trifoliolada). Para a cultivar Rosinha (Figura 21B), a única diferença significativa observada foi para a região infectada e apresentando baixa severidade de doença, onde o valor de atividade foi 32% maior em relação ao controle.

Com relação à atividade de quitinase, os resultados para as cultivares Carioca e Rosinha estão representados na **Figura 22**. Para a cultivar Carioca (Figura 22A), embora não significativamente diferente em relação ao controle, houve incrementos de 18% na atividade enzimática para regiões infectadas da 2ª folha trifoliolada e com média e alta severidade de doença. Para a cultivar Rosinha (Figura 22B), os incrementos na atividade enzimática foram mais acentuados em relação ao controle, podendo-se observar valores 59%, 30% e 34% maiores para regiões infectadas e apresentando baixa, média e alta severidade de doença, respectivamente. Não foi observada indução da atividade de quitinase à distância do local de infecção (3ª folha trifoliolada) para ambas as cultivares.

Observando-se os valores de atividade enzimática para a 2ª folha trifoliolada não infectada (testemunha não inoculada) pôde-se notar que

constitutivamente, a cultivar Carioca (moderadamente suscetível) apresentou valores 18% e 20% maiores de β -1,3 glucanase e quitinase, respectivamente, em relação à cultivar Rosinha (altamente suscetível).

4.5.2 Patossistema feijoeiro – *U. appendiculatus* (ferrugem)

Os resultados da atividade de β -1,3 glucanase para as cultivares Carioca e Rosinha estão representados na **Figura 23**. Para a cultivar Carioca (Figura 23A) houve incrementos de 28% e 15% na atividade enzimática para regiões com baixa e média severidade, respectivamente, bem como uma indução à distância do local de infecção (3ª folha trifoliolada), onde a atividade foi 62% maior em relação ao controle. Para a cultivar Rosinha (Figura 23B) houve um incremento de 32% apenas para a região infectada e com média severidade de doença.

Com relação à atividade de quitinase, os resultados para as cultivares Carioca e Rosinha estão representados na **Figura 24**. Para a cultivar Carioca (Figura 24A), observou-se a mesma tendência com relação à atividade de β -1,3 glucanase, com incrementos de 24% e 11% para regiões infectadas e com baixa e média severidade, respectivamente, e de 60% para a 3ª folha trifoliolada não inoculada. Para a cultivar Rosinha (Figura 24B), novamente foi observado um incremento de 29% apenas para a região infectada e com média severidade de doença.

Observando-se os valores de atividade enzimática para a 2ª folha trifoliolada não infectada (testemunha não inoculada) pôde-se notar que constitutivamente, a cultivar Carioca (moderadamente suscetível) apresentou valores 15% e 9% maiores de β -1,3 glucanase e quitinase, respectivamente, em relação à cultivar Rosinha (altamente suscetível).

4.5.3 Discussão

Conforme comentado para o patossistema feijoeiro – *P. griseola*, as atividades de β -1,3 glucanase e quitinase foram induzidas somente em regiões colonizadas de ambas as cultivares. Na cultivar Rosinha, altamente suscetível, os incrementos foram em torno de 20% maiores do que os observados para a cultivar Carioca (moderadamente suscetível). Não houve indução de atividade na 3ª folha trifoliolada não inoculada.

A indução local e em maior quantidade nas atividades de β -1,3 glucanase e quitinase verificada para a cultivar altamente suscetível, pode ser devido ao fato de que essas regiões colonizadas apresentam maior quantidade de micélio fúngico quando comparadas com a cultivar moderadamente suscetível (conforme será visto no item 4.6). Dessa forma, uma maior quantidade de monômeros constituintes da parede celular fúngica poderiam estar sendo liberados e atuando localizadamente como elicitores para a síntese de elevadas quantidades de β -1,3 glucanase e quitinase na cultivar Rosinha. Tem sido verificado que em alguns patossistemas, o acúmulo de compostos envolvidos na defesa das plantas pode estar mais relacionado ao avanço da colonização pelo patógeno do que com a resistência do hospedeiro (Mozzetti et al., 1995). A menor quantidade de micélio em regiões colonizadas da cultivar Carioca pode ser resultante do maior nível constitutivo de β -1,3 glucanase e quitinase desse material vegetal.

Através dos valores de atividade induzida de β -1,3 glucanase e quitinase observados para as cultivares Carioca e Rosinha, pode-se notar que não está havendo uma relação direta entre o nível de resistência e a atividade enzimática. Isto pode ser pelo fato de que essas hidrolases, como constituintes do mecanismo geral de defesa da planta, não seriam capazes de explicar, isoladamente, os graus de resistência das cultivares a *P. griseola*. Vogelsang & Barz (1993) verificaram que cultivares resistentes e suscetíveis de ervilha não apresentavam nenhuma diferença significativa na quantidade e no tempo para

acúmulo de isoformas de β -1,3 glucanase e quitinase após a inoculação com *Ascochyta rabiei*, e que provavelmente outros mecanismos de defesa seriam os responsáveis pelas respostas finais da planta à infecção. Por outro lado, a inoculação de diferentes cultivares de feijão com *Colletotrichum lindemuthianum* resulta em marcante incremento na atividade dessas enzimas somente em materiais resistentes ao patógeno (Daugrois et al., 1990). Dessa forma, diferentes comportamentos podem ser verificados dependendo do patossistema em questão.

No patossistema feijoeiro – *U. appendiculatus*, as atividades de β -1,3 glucanase e quitinase para a cultivar Carioca, foram induzidas tanto em regiões infectadas quanto à distância do local de infecção. Para a cultivar Rosinha, as induções ocorreram apenas para regiões infectadas e com média severidade de doença, e novamente, foram sempre maiores àquelas observadas para a cultivar Carioca.

A inoculação de folhas inferiores do dossel de várias plantas com certos fitopatógenos, tem conduzido a um incremento na resistência à infecção em folhas superiores não inoculadas (Kuc, 1982). Murray & Walters (1992), por exemplo, encontraram incrementos na resistência de folhas superiores não infectadas de *V. faba* quando as folhas inferiores eram inoculadas com *U. viciae-fabae*. Fenômeno semelhante a este poderia estar ocorrendo para a cultivar Carioca infectada com *U. appendiculatus*. No entanto, não se pode afirmar que os incrementos nas atividades de β -1,3 glucanase e quitinase, observados na 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente, resultarão em aumento da resistência dessa folha ao patógeno, pois não foi realizada a inoculação de desafio nessas folhas induzidas (ou seja, uma nova inoculação na 3ª folha após a inoculação prévia na 2ª folha), e também, a atividade induzida dessas hidrolases não parece estar relacionada ao nível de resistência das cultivares aos patógenos utilizados nesse trabalho.

4.6 Quantificação da colonização fúngica

As curvas padrão relacionando a quantidade de micélio de *P. griseola* com o teor de ergosterol, ou área de pico obtido no cromatógrafo, estão representadas no **Apêndice 7** (A e B, respectivamente). A concentração de ergosterol no micélio de *P. griseola* foi de aproximadamente 0,07% do seu peso seco. Os esteróis (entre eles o ergosterol é o mais abundante) estão presentes nos fungos em valores que equivalem geralmente a 1% ou menos do peso seco (Moore-Landecker, 1996). Para *U. appendiculatus*, a extração de ergosterol a partir de diferentes quantidades de urediniósporos não permitiu a obtenção de valores correlacionáveis.

A quantidade de micélio de *P. griseola* presente em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno, respectivamente, está representada na **Tabela 3**. Os valores observados para a cultivar Rosinha foram 65% e 55% maiores para regiões de baixa e média severidade, respectivamente, em relação aqueles da cultivar Carioca. Isto indica que para um mesmo valor de severidade, a cultivar altamente suscetível apresenta maior quantidade de micélio do que a cultivar moderadamente suscetível.

Com relação ao patossistema feijoeiro – *U. appendiculatus*, os resultados do conteúdo de ergosterol estão representados na **Tabela 4**. Em regiões de baixa severidade não houve diferença significativa no teor de ergosterol entre as cultivares Carioca e Rosinha. No entanto, sob média severidade de doença, a cultivar Rosinha apresentou 69% mais ergosterol nas áreas colonizadas do que a cultivar Carioca.

Resultado semelhante quando se compara a colonização fúngica entre materiais vegetais com diferentes níveis de resistência a um patógeno, foi encontrado por Stangarlin & Pascholati (1999). Esses autores verificaram que regiões de folhas de dois genótipos de milho apresentando um mesmo tipo de sintoma, caracterizado por pontos cloróticos, possuíam diferentes quantidades

de micélio do patógeno *E. turcicum*. No genótipo suscetível a quantidade de micélio foi pelo menos quatro vezes maior do que a presente no genótipo resistente.

4.7 Discussão geral

A **Tabela 5** apresenta de forma resumida os resultados obtidos neste trabalho. Durante os itens de discussão anteriormente comentados, algumas relações já foram estabelecidas entre os resultados. A seguir estão mais alguns comentários.

4.7.1 Patossistema feijoeiro – *P. griseola*

O patógeno hemibiotrófico é aquele que não necessita da manutenção das células vivas do hospedeiro para que possa sobreviver. Diante disso, o que se pôde observar para o patossistema feijoeiro – *P. griseola* foram, de maneira geral, efeitos mais deletérios aos hospedeiros Carioca e Rosinha (de forma mais acentuada neste último) quando em comparação à infecção com o biotrófico *U. appendiculatus* (como será visto no item seguinte). Em nenhum momento foram encontrados incrementos nos teores de clorofilas (itens 4.1.1 e 4.1.2) para ambas as cultivares; pelo contrário, o decréscimo no conteúdo de pigmentos podia ocorrer tanto em regiões infectadas da cultivar Carioca quanto em folhas não colonizadas pelo patógeno na cultivar Rosinha. Essa redução nos níveis de clorofila em áreas apresentando lesões não estaria ocorrendo apenas devido à formação de necrose, uma vez que os resultados do conteúdo de pigmentos, expressos por unidade de área verde remanescente na amostra, já está levando em consideração a perda de tecido necrosado.

As atividades inicial, total e porcentagem de ativação da rubisco (itens 4.3.1 e 4.3.2) também foram reduzidas. A única exceção foi em folhas não inoculadas de plantas doentes da cultivar Carioca, onde se pôde notar um

possível efeito compensatório nas atividades de rubisco, provavelmente em função do nível de resistência do hospedeiro, já que não houve alteração no conteúdo de clorofila para essas regiões.

Em folhas infectadas ou não da cultivar Carioca e em folhas infectadas da cultivar Rosinha, foi possível estabelecer uma relação entre indução/não indução das enzimas de defesa da planta, β -1,3 glucanase e quitinase, e o decréscimo/incremento, respectivamente, nas atividades da rubisco. Somssich & Hahlbrock (1998) comentam que o significado metabólico da repressão de alguns genes do metabolismo normal da célula, concomitante com a ativação de outros durante a defesa da planta à invasão pelo patógeno, está provavelmente associado com a regulação de todas as atividades celulares disponíveis e à mobilização de recursos para se evitar o avanço da infecção.

4.7.2 Patossistema feijoeiro – *U. appendiculatus*

No patossistema feijoeiro – *U. appendiculatus*, em relação à colonização fúngica, a cultivar Rosinha (altamente suscetível) apresentou 69% mais ergosterol em regiões infectadas do que a cultivar Carioca (moderadamente suscetível) (item 4.6). Isto significa que, embora o incremento no teor de clorofila que ocorreu para regiões infectadas da cultivar Carioca (item 4.2.1) tenha sido em média duas vezes maior do que o observado para as mesmas regiões da cultivar Rosinha (item 4.2.2), não parece ter havido uma vantagem para o patógeno biotrófico, o qual acabou por ter a sua colonização reduzida nessa cultivar moderadamente suscetível. Além disso, nessas mesmas regiões da cultivar Carioca, a atividade inicial da rubisco (item 4.4.1) foi reduzida, o que poderia restringir o nível de fotoassimilados para o patógeno, e também houve indução nas atividades de β -1,3 glucanase e quitinase (item 4.5.2). Wang (1961) comenta que a indução para retenção de clorofilas em áreas infectadas com patógenos biotróficos causadores de

ferrugem pode ser uma vantagem para o fungo, o qual poderia ser provido com uma fonte de carboidratos prontamente disponíveis. Dessa forma, a possibilidade de sucesso ou falha no estabelecimento e subsequente desenvolvimento do parasita no hospedeiro pode ser governada pela habilidade do fungo em estabelecer seu domínio de influência (ex.: indução na retenção de clorofila), ou pela habilidade do hospedeiro em resistir à influência do invasor. No caso da cultivar Carioca infectada com *U. appendiculatus*, estaria predominando a habilidade do hospedeiro. No caso da cultivar Rosinha estaria predominando a habilidade do patógeno, pois embora tenha havido indução de β -1,3 glucanase e quitinase (item 4.5.2), houve também indução no teor de clorofila (item 4.2.2) e na atividade da rubisco (item 4.4.2), e uma colonização mais acentuada pelo fungo (item 4.6).

Com relação à rubisco, não houve relação entre resistência do cultivar e nível de atividade. Na cultivar moderadamente suscetível, a atividade inicial foi reduzida tanto em folhas infectadas quanto na 3ª folha trifoliolada não inoculada, ocorrendo o oposto para a cultivar altamente suscetível. Berghaus & Reisener (1985) mostraram que não houve correlação entre a resistência de diferentes cultivares de trigo e o incremento na fotossíntese observado após a infecção com *P. graminis* f.sp. *tritici*, sugerindo que isto pode ser um fenômeno cultivar-específico. Em nosso trabalho, no entanto, não se pode afirmar se os incrementos nas atividades de rubisco, ocorridos para a cultivar Rosinha infectada com *U. appendiculatus*, irão resultar em aumento da fotossíntese.

Conforme comentado para o patossistema feijoeiro – *P. griseola*, também foi possível observar uma relação entre indução/não indução de β -1,3 glucanase e quitinase, e o decréscimo/incremento, respectivamente, na atividade inicial da rubisco para a cultivar Carioca infectada com *U. appendiculatus*.

Figura 11 - Conteúdo de clorofilas *a* (A), *b* (B) e clorofila total (C) e atividade de clorofilase (D) em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *P. griseola*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 12 - Conteúdo de clorofilas *a* (A), *b* (B) e clorofila total (C) e atividade de clorofilase (D) em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *P. griseola*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 13 – Sintomas de mancha angular nas cultivares de feijoeiro Carioca (A) e Rosinha (B), 12 dias após a inoculação com *P. griseola*.

Tabela 1. Relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* presentes em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno *P. griseola*, respectivamente. Amostras coletadas 12 após a inoculação.

Regiões amostradas ¹	Taxa de clorofilas <i>a/b</i>
cv. CARIOCA	
Baixa	2,73 ± 0,05 a ²
Média	2,75 ± 0,00 a
Controle (2 ^a)	2,80 ± 0,07 a
Doente	2,77 ± 0,02 a
Controle (3 ^a)	2,75 ± 0,03 a
cv. ROSINHA	
Baixa	2,70 ± 0,00 a
Média	2,62 ± 0,00 a
Controle (2 ^a)	2,70 ± 0,00 a
Doente	2,69 ± 0,10 a
Controle (3 ^a)	2,66 ± 0,02 a

¹Baixa e média: regiões da 2^a folha trifoliolada inoculada, com severidades entre 5-10% e 20-25%, respectivamente; Doente: 3^a folha trifoliolada não inoculada de planta doente; Controles: 2^a e 3^a folhas trifolioladas não inoculadas de plantas sadias. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação.

²Valores representam a média ± erro padrão. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Figura 14 – Conteúdo de clorofilas *a* (A), *b* (B) e clorofila total (C) e atividade de clorofilase (D) em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 15 – Conteúdo de clorofilas *a* (A), *b* (B) e clorofila total (C) e atividade de clorofilase (D) em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 16 – Sintomas de ferrugem nas cultivares de feijoeiro Carioca (**A**) e Rosinha (**B**), 7 dias após a inoculação com *U. appendiculatus*.

Tabela 2. Relação entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* presentes em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno *U. appendiculatus*, respectivamente. Amostras coletadas 7 dias após a inoculação.

Regiões amostradas ¹	Taxa de clorofilas <i>a/b</i>
cv. CARIOCA	
Baixa	2,52 ± 0,06 a ²
Média	2,71 ± 0,06 ab
Controle (2 ^a)	2,72 ± 0,01 b
Doente	2,84 ± 0,04 b
Controle (3 ^a)	2,80 ± 0,01 b
cv. ROSINHA	
Baixa	2,55 ± 0,06 a
Média	2,67 ± 0,01 ab
Controle (2 ^a)	2,78 ± 0,05 b
Doente	2,58 ± 0,05 a
Controle (3 ^a)	2,85 ± 0,00 b

¹Baixa e média: regiões da 2^a folha trifoliolada inoculada, com severidades entre 5-10% e 20-25%, respectivamente; Doente: 3^a folha trifoliolada não inoculada de planta doente; Controles: 2^a e 3^a folhas trifolioladas não inoculadas de plantas saudas. Amostras coletadas 7 dias após a inoculação.

²Valores representam a média ± erro padrão. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Figura 17 – Atividades inicial (A) e total (B) e porcentagem de ativação (C) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *P. griseola*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 18 – Atividades inicial (A) e total (B) e porcentagem de ativação (C) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *P. griseola*. Baixa, média e alta: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10%, 25-30% e 40-45%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 19 – Atividades inicial (A) e total (B) e porcentagem de ativação (C) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Carioca inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 20 – Atividades inicial (A) e total (B) e porcentagem de ativação (C) da rubisco em folhas de feijoeiro da cultivar Rosinha inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 21 – Atividade de β -1,3 glucanase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (A) e Rosinha (B), inoculadas com *P. griseola*. Baixa, média e alta: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10%, 25-30% e 40-45%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 22 – Atividade de quitinase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (A) e Rosinha (B), inoculadas com *P. griseola*. Baixa, média e alta: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10%, 25-30% e 40-45%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 23 – Atividade de β -1,3 glucanase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (A) e Rosinha (B), inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Figura 24 – Atividade de quitinase em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca (A) e Rosinha (B), inoculadas com *U. appendiculatus*. Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada (inoculada) com severidades de 5-10% e 25-30%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada (não inoculada) de planta doente; Cont.2 e Cont.3: 2ª e 3ª folhas trifolioladas de planta testemunha (não inoculada), respectivamente. As barras representam o erro padrão da média. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3. Quantidade de micélio de *P. griseola*, com base no conteúdo de ergosterol, presente em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno, respectivamente. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação.

Regiões amostradas ¹	Quantidade de ergosterol (µg/g P.C.) ²	Quantidade de micélio (mg/g P.C.) ²
cv. CARIOCA		
Baixa	47,89 ± 0,1 a	71,05 ± 0,1 a
Média	71,08 ± 5,3 ab	105,45 ± 7,9 ab
Doente	n.d.	n.d.
Controles	n.d.	n.d.
cv. ROSINHA		
Baixa	78,76 ± 1,0 bc ³	116,84 ± 14,7 bc
Média	110,47 ± 0,1 d	163,89 ± 0,1 d
Doente	n.d. ⁴	n.d.
Controles	n.d.	n.d.

¹Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada inoculada, com severidades entre 5-10% e 20-25%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente; Controles: 2ª e 3ª folhas trifolioladas não inoculadas de plantas sadias. Amostras coletadas 10 dias após a inoculação.

²Valores calculados em relação a massa de pó cetônico (P.C.).

³Valores representam a média ± erro padrão. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

⁴Não detectado (n.d.).

Tabela 4. Quantidade de ergosterol de *U. appendiculatus* presente em folhas de feijoeiro das cultivares Carioca e Rosinha, com moderada e alta suscetibilidade ao patógeno, respectivamente. Amostras coletadas 7 dias após a inoculação.

Regiões amostradas ¹	Quantidade de ergosterol ($\mu\text{g/g P.C.}$) ²
cv. CARIOCA	
Baixa	$50,67 \pm 4,9$ ab
Média	$63,10 \pm 3,4$ bc
Doente	n.d.
Controles	n.d.
cv. ROSINHA	
Baixa	$49,39 \pm 0,3$ a ³
Média	$106,71 \pm 0,1$ d
Doente	n.d. ⁴
Controles	n.d.

¹Baixa e média: regiões da 2ª folha trifoliolada inoculada, com severidades entre 5-10% e 20-25%, respectivamente; Doente: 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente; Controles: 2ª e 3ª folhas trifolioladas não inoculadas de plantas sadias. Amostras coletadas 7 dias após a inoculação.

²Valores calculados em relação a massa de pó cetônico (P.C.).

³Valores representam a média $\pm$ erro padrão. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

⁴Não detectado (n.d.).

Tabela 5. Sumário dos resultados referentes às alterações nas atividades de rubisco, clorofilase, β -1,3 glucanase e quitinase, e no conteúdo de ergosterol em cultivares de feijoeiro infectados com *P. griseola* ou *U. appendiculatus*.

Característica estudada	<i>P. griseola</i> ¹				<i>U. appendiculatus</i> ¹			
	Carioca ²		Rosinha ²		Carioca		Rosinha	
	FI ³	FNI ³	FI	FNI	FI	FNI	FI	FNI
Conteúdo de clorofila:								
<i>a</i>	↓ ⁴	-	-	↓	↑	↓	↑	↑
<i>b</i>	↓	-	-	↓	↑	↓	↑	↑
total	↓	-	-	↓	↑	↓	↑	↑
<i>alb</i>	-	-	-	-	↓	-	↓	↓
Atividade de clorofilase:	↑	-	-	↑	↓	↑	↓	↓
Atividade de rubisco:								
inicial	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑
total	↓	↑	↓	↓	↑	↑	-	-
% ativação	-	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑
Atividade de:								
β -1,3 glucanase	-	-	↑	-	↑	↑	↑	-
quitinase	↑	-	↑	-	↑	↑	↑	-
Colonização: ⁵								
	<	ND	>	ND	<	ND	>	ND

¹*P. griseola*: hemibiotrófico causador de mancha angular; *U. appendiculatus*: biotrófico causador de ferrugem.

²Carioca e Rosinha: moderadamente e altamente suscetível, respectivamente, aos patógenos.

³FI: 2ª folha trifoliolada inoculada; FNI: 3ª folha trifoliolada não inoculada de planta doente.

⁴(↑): incremento; (↓): decréscimo; (-): sem alteração.

⁵Baseado no conteúdo de ergosterol. (>): maior; (<): menor. Valores comparativos entre as duas cultivares. (ND): não detectado.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

- 1) As alterações no metabolismo fotossintético, baseado nas atividades de clorofilase e rubisco, devido à infecção com o hemibiotrófico *P. griseola* ou o biotrófico *U. appendiculatus*, são dependentes da cultivar em questão bem como do tipo de região amostrada.
- 2) A infecção com *P. griseola* causa efeitos prejudiciais ao metabolismo fotossintético da área verde remanescente, aparentemente sadia, de folha infectada. Em materiais mais resistentes pode haver um efeito compensatório em folhas sadias de plantas doentes.
- 3) A infecção com *U. appendiculatus* pode favorecer o metabolismo fotossintético tanto em folhas infectadas quanto em folhas sadias de plantas doentes.
- 4) O conteúdo de clorofilas é dependente da atividade de clorofilase.
- 5) Ao contrário do que ocorre a nível constitutivo, não há relação entre as atividades de β -1,3 glucanase e quitinase induzidas após a infecção com os patógenos e o grau de resistência das cultivares.

6) Em algumas combinações cultivares – patógenos pode haver uma relação inversa entre a indução das enzimas β -1,3 glucanase e quitinase e a atividade de rubisco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B.; FORRENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β -1,3 glucanase in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.45, p.395-400, 1970.
- ABO-FOUL, S.; RASKIN, V.I.; SZTEJNBERG, A.; MARDER, J.B. Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. **Phytopathology**, v.86, p.195-199, 1996.
- AGRIOS, G.N. Effects of pathogens on plant physiological functions. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant Pathology**. San Diego, Academic Press, 1997. cap. 4, p.83-92.
- AMIR-SHAPIRA, D.; GOLDSCHMIDT, E.E.; ALTMAN, A. Autolysis of chlorophyll in aqueous and detergent suspensions of chloroplast fragments. **Plant Science**, v.43, p.201-206, 1986.
- AMORIM, L. Colonização e reprodução. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1. cap.16, p.309-324.

- ARNON,D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, p.1-15, 1949.
- AYRES,P.G. Water and solutes in host-pathogen relations. In: WALTERS,D.R.; SCHOLLES,J.D.; BRYSON,R.J.; PAUL,N.D.; McROBERTS,N. (Ed.). **Physiological Responses of Plants to Pathogens: Aspects of Applied Biology 42**. Warwick: AAB, 1995. p.161-167.
- BAILISS,K.W. Infection of cucumber cotyledons by Cucumber Mosaic Virus and the participation of chlorophyllase in the development of chlorotic lesions. **Annals of Botany**, v.34, p.647-655, 1970.
- BASSANEZI,R.B. Interações entre o mosaico-em-desenho do feijoeiro e duas doenças fúngicas, ferrugem e mancha angular, em plantas de feijoeiro. Piracicaba, 1995. 123p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BASSANEZI,R.B.; MARTINS,M.C.; GODOY,C.V.; AMORIM,L.; BERGAMIN FILHO,A. Efeito da antracnose na eficiência fotossintética do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.520-524, 1997.
- BASTIAANS,L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, v.81, p.611-615, 1991.
- BENHAMOU,N.; GRENIER,J.; CHRISPEELS,M.J. Accumulation of β -fructosidase in the cell wall of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. **Plant Physiology**, v.97, p.739-750, 1991.

- BERGHAUS,R.; REISENER,H.J. Changes in photosynthesis of wheat plants infected with wheat stem rust (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*). **Phytopathologische Zeitschrift**, v.112, p.165-172, 1985.
- BERGHAUS,R.; REISENER,H.J.; ARENZ,H.; FRANCK,U.F. Changes in the Hill reaction and the chlorophyll fluorescence of chloroplasts isolated from wheat plants infected with stem rust (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*). **Journal of Phytopathology**, v.118, p.123-130, 1987.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF,H.R.; ÖQUIST,G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL,D.O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD ,R. C.; LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and Production in a Changing Environment**: a field and laboratory manual. London: Chapman & Hall, 1993; p.193-206.
- BOLLER,T.; METRAUX,J.P. Extracellular localization of chitinase in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.33, p.11-16, 1988.
- BOWDEN,R.L.; ROUSE,D.I.; SHARKEY,T.D. Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahliae* in potato. **Plant Physiology**, v.94, p.1048-1055, 1990.
- BRADFORD,M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRESTIC,M.; CORNIC,G.; FRYER,M.J.; BAKER,N.R. Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in French bean leaves from photoinhibition during drought stress? **Planta**, v.196, p.450-457, 1995.

- BUTZ,N.D.; SHARKEY,T.D. Activity ratios of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase accurately reflect carbamylation ratios. **Plant Physiology**, v.89, p.735-739, 1989.
- CHOU,H.M.; ROLFE,S.R.; SCHOLLES,J.D. The effect of *Albugo candida* on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of *Arabidopsis thaliana*. In: WALTERS,D.R.; SCHOLLES,J.D.; BRYSON,R.J.; PAUL,N.D.; McROBERTS,N. (Ed.). **Physiological Responses of Plants to Pathogens**: Aspects of Applied Biology 42. Warwick: AAB, 1995. p.149-153.
- CONN,E.E.; STUMPF,P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1990. 525p.
- DALLA PRIA,M.; BERGAMIN FILHO,A. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Isariopsis griseola* e *Alternaria* sp. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 17, Piracicaba, 1995. Resumos **Summa Phytopathologica**, v.21, n.1, 1995. p.57.
- DAUGROIS,J.H.; LAFITTE,C.; BARTHE,J.P.; TOUZE,A. Induction of β -1,3 glucanase and chitinase activity in compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum lindemuthianum* and bean cultivars. **Journal of Phytopathology**, v.130, p.225-234, 1990.
- DAVIS,M.W.; LAMAR,R.T. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.3, p.189-198, 1992.

- DEL PELOSO,M.J.; YOKOYAMA,L.P.; PEREIRA,P.A.A. Situação atual da cultura do feijão no Brasil. In: FANCELLI,A.L.; DOURADO NETO,D. (Ed.). **Tecnologia da produção do feijão irrigado**. Piracicaba: Publique, 1997. p.135-139.
- EBEL,J. Phytoalexins synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.235-264, 1986.
- FANCELLI,A.L.; DOURADO NETO,D. Ecofisiologia e fenologia do feijoeiro. In: FANCELLI,A.L.; DOURADO NETO,D. (Ed.). **Tecnologia da produção do feijão irrigado**. Piracicaba: Publique, 1997. p.100-120.
- FARRAR,J.F. Beyond photosynthesis: the translocation and respiration of diseased leaves. In: AYRES,P.G. (Ed.). **Pests and Pathogens: plant responses to foliar attack**. Lancaster: Bios Scientific Publishers, 1992. p.107-128.
- GALLI,M.A. Influência de fontes de matéria orgânica na formação de ectomicorrizas em mudas de *Eucalyptus citriodora* inoculadas com *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1996. 90p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- GARRY,G.; JEUFFROY,M.H.; NEY,B.; TIVOLI,B. Effects of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on the photosynthesizing leaf area and the photosynthetic efficiency of the green leaf area of dried-pea (*Pisum sativum*). **Plant Pathology**, v.47, p.473-479, 1998.
- GOODMAN,R.N.; KIRÁLY,Z.; WOOD,K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia, University of Missouri Press, 1986. 433p.

- GORDON,T.R.; DUNIWAY,J.M. Effects of powdery mildew infection on the efficiency of CO₂ fixation and utilization by sugar beet leaves. **Plant Physiology**, v.69, p.139-142, 1982.
- GORDON,T.R.; WEBSTER,R.K. Evaluation of ergosterol as an indicator of infestation of barley seed by *Drechslera graminea*. **Phytopathology**, v.74, n.9, p.1125-1127, 1984.
- GRAHAM,T.L.; GRAHAM,M.Y. Cellular coordination of molecular responses in plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, n.5, p.415-422, 1991.
- GRETENKORT,M.A.; INGRAM,D.S. The use of ergosterol as a quantitative measure of the resistance of cultured tissues of *Brassica napus* ssp. *oleifera* to *Leptosphaeria maculans*. **Journal of Phytopathology**, v.138, p.217-224, 1993.
- GRIFFIN,D.H. Chemistry of the fungal cell. In: GRIFFIN,D.H. (Ed.). **Fungal Physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994. cap.2, p.23-62.
- GRIFFITHS,H.M.; JONES,D.J.; AKERS,A. A bioassay for predicting the resistance of wheat leaves to *Septoria nodorum*. **Annals of Applied Biology**, v.107, p.293-300, 1985.
- GUYLA,T.; DUNLEAVY,J.M. Inhibition of chlorophyll synthesis by *Pseudomonas glycinea*. **Crop Science**, v.19, p.251-264, 1979.
- GUTTERIDGE,S. Limitations of the primary events of CO₂ fixation in photosynthetic organisms: the structure and mechanism of rubisco. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1015, p.1-14, 1990.

HALL,R. **Compedium of bean diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1991. 73p.

HIGGINS,C.M.; MANNERS,J.M.; SCOTT,K.J. Decrease in three messenger RNA species coding for chloroplast proteins in leaves of barley infected with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. **Plant Physiology**, v.78, p.891-894, 1985.

HODGES,C.F. Endogenous ethylene response and chlorophyll loss in sequentially older leaves of *Poa pratensis* infected by *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Plant Physiology**, v.136, p.670-674, 1990.

HODGES,C.F.; COLEMAN,L.W. Ethylene-induced chlorosis in the pathogenesis of *Bipolaris sorokiniana* leaf spot of *Poa pratensis*. **Plant Physiology**, v.75, p.462-465, 1984.

HODGES,C.F.; CAMPBELL,D.A. Inhibition of ethylene biosynthesis and the endogenous ethylene and chlorophyll content of *Poa pratensis* leaves infected by *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.699-703, 1993.

HOLBROOK,G.P.; GALASINSKI,S.C.; SALVUCCI,M.E. Regulation of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate. **Plant Physiology**, v.97, p.894-899, 1991.

HOLDEN,M. The breakdown of chorophyll by chlorophyllase. **Biochemical Journal**, v.78, p.359-364, 1961.

HORSFALL,J.G.; COWLING,E.B. **Plant Diseased - an Advanced Treatise: How Plants Defend Themselves**. New York: Academic Press, 1980. v.5.

HUTCHESON, S.W.; BUCHANAN, B. Bioenergetic and metabolic disturbances in diseased plants. In: CALLOW, J.A. (Ed.). **Biochemical Plant Pathology**. Chichester: John Wiley, 1983. p.327-245.

ISAAC, S. **Fungal-plant interactions**. London, Chapman & Hall, 1992. 418p.

JANG, J.C.; SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. **The Plant Cell**, v.6, p.1665-1679, 1994.

JOHAL, C.S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S.P. Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal Botany**, v.73 (Supl.1), p.S468-S474, 1995.

JOHNSON, B.N.; MCGILL, W.B. Comparasion of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to infection. **Canadian Journal Forest Research**, v.20, p.1125-1131, 1990.

JOHNSON-FLANAGAN, A.M.; SPENCER, M.S. Chlorophyllase and peroxidase activity during degreening of maturing canola (*Brassica napus*) and mustard (*Brassica juncea*) seed. **Physiologia Plantarum**, v.97, p.353-359, 1996.

KOBZA, J.; SEEMANN, J.R. Ligth-dependent kinetics of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate metabolism and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity *in vivo*. **Plant Physiology**, v.89, p.174-179, 1989.

KOMBRINK,E.; HAHLBROCK,K. Rapid, systemic repression of the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small-subunit mRNA in fungus-infected or elicitor-treated potato leaves. **Planta**, v.181, p.216-219, 1990.

KUC,J. Induced immunity to plant disease. **BioScience**, v.32, p.854-860, 1982.

LEHNINGER,A.L.; NELSON,D.L.; COX,M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

LEITE,B.; PASCHOLATI,S.F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO,A.; KIMATI,H.; AMORIM,L. (Ed.): **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.393-416.

LEVER,M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.

LINTHORST,H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.10, n.2, p.123-150, 1991.

LIVNE,A. Photosynthesis in healthy and rust-affected plants. **Plant Physiology**, v.39, p.614-621, 1964.

LIVNE,A.; DALY,J.M. Translocation in healthy and rust-affected leaves. **Phytopathology**, v.56, p.170-175, 1966.

- LONG,S.P.; HÄLLGREN,J.E. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and in the laboratory. In: HALL,D.O.; SCURLOCK, J. M. O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H. R.; LEEGOOD ,R. C.; LONG, S. P. (Ed.). **Photosynthesis and Production in a Changing Environment: a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993, p.129-167.
- LUCAS,J.A. The physiology of plant disease. In: LUCAS,J.A. (Ed.). **Plant Pathology and Plant Pathogens**. Cambridge: Blackwell Science, 1998. cap.7, p.109-122.
- LUKENS,J.H.; MATHEWS,D.E.; DURBIN,R.D. Effect of tagetitoxin on the levels of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, ribosomes, and RNA in plastids of wheat leaves. **Plant Physiology**, v.84, p.808-813, 1987.
- LUTTRELL,E.S. Parasitism of fungi on vascular plants. **Mycologia**, v.66, n.1, p.1-15, 1974.
- MADEIRA,A.C.; CLARK,J.A. The principles of resource capture in relation to necrotrophic infection. In: WALTERS,D.R.; SCHOLLES,J.D.; BRYSON,R.J.; PAUL,N.D.; McROBERTS,N. (Ed.). **Physiological Responses of Plants to Pathogens: Aspects of Applied Biology 42**. Warwick: AAB, 1995. p.19-31.
- MAGALHÃES,A.C.N. Fotossíntese. In: FERRI,M.G. (Coord.). **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. v.1, p.117-168.
- MARTIN,F.; DELARUELLE,C.; HILBERT,J.L. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, v.94, n.8, p.1059-1064, 1990.

- MATCHAM,S.E.; JORDAN,B.R.; WOOD,D.A. Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. In: GRAINGER,J.M.; LYNCH,J.M. (Ed.). **Microbiological Methods for Environmental Biotechnology**. London: Academic Press, 1984. p. 5-18.
- MATILE,P.; DÜGGELIN,T.; SCHELLENBERG,M.; RENTSCH,D.; BORTLIK,K.; PEISKER,C.; THOMAS,H. How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.27, p.595-604, 1989.
- MENEZES,J.R.; MENTEN,J.O.M. Manejo de doenças na cultura do feijão. In: FANCELLI,A.L.; DOURADO NETO,D. (Ed.). **Tecnologia da Produção do Feijão Irrigado**. Piracicaba: Publique, 1997. p.140-152.
- MEPSTED,R.; FLOOD,J.; COOPER,R.M. Effects of Fusarium vascular wilt disease on the physiology and growth of oil palm. In: WALTERS,D.R.; SCHOLLES,J.D.; BRYSON,R.J.; PAUL,N.D.; McROBERTS,N. (Ed.). **Physiological Responses of Plants to Pathogens: Aspects of Applied Biology 42**. Warwick: AAB, 1995. p.177-184.
- MISAGHI,I.J. **Physiology and Biochemistry of Plant-pathogen Interactions**. Plenum Press, 1982. 286p.
- MOORE-LANDECKER,E. Physiology and reproduction – metabolism. In: MOORE-LANDECKER,E. (Ed.). **Fundamentals of the Fungi**. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. cap.9, p.251-278.

- MOULY,A.; ROBY,D.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ,M.T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase small subunit transcripts as a susceptibility reflecting molecular marker in sunflower infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Science**, v.56, p.219-225, 1988.
- MOZZETTI,C.; FERRARIS,L.; TAMIETTI,G.; MATTA,A. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as marker of incompatibility in different *Phytophthora* – pepper interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p.95-107, 1995.
- MURRAY,D.C.; WALTERS,D.R. Increased photosynthesis and resistance to rust infection in upper, uninfected leaves of rusted broad bean (*Vicia faba* L.). **New Phytologist**, v.120, p.235-242, 1992.
- NEMA,A.G. Changes in chlorophyll, nitrogen, protein, amino acid and some enzyme contents in betelvine leaves infected with *Xanthomonas campestris* pv. *betlicola*. **Indian Phytopathology**, v.44, n.1, p.9-14, 1991.
- NYLUND,J.E.; WALLANDER,H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. **Methods in Microbiology**, v.24, p.77-88, 1992.
- OWERA,S.A.P.; FARRAR,J.F.; WHITBREAD,R. Translocation from leaves of barley infected with brown rust. **New Phytologist**, v.94, p.111-123, 1983.
- PASCHOLATI,S.F. Fitopatógenos: fitotoxinas e hormônios. In: BERGAMIN FILHO,A.; KIMATI,H.; AMORIM,L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995a. v.1. cap.20, p.365-392.

PASCHOLATI,S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO,A.; KIMATI,H.; AMORIM,L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995b. v.1. cap. 19; p.343-364.

PASCHOLATI,S.F.; LEITE,B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ,W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994. v.2, p.1-52.

PASCHOLATI,S.F.; LEITE,B. Hospedeiro: mecanismos 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.

PASCHOLATI,S.F.; STANGARLIN,J.R.; LEITE,B.; SCHWAN-ESTRADA,K.R.F. Mecanismos de patogenicidade em fungos. In: LUZ,W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1998. v.6, p.1-47.

PENNYPACKER,B.W.; KNIEVEL,D.P.; LEATH,K.T.; PELL,E.J.; HILL Jr.,R.R. Analysis of photosynthesis in resistant and susceptible alfafa clones infected with *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, v.80, p.1300-1306, 1990.

PENNYPACKER,B.W.; LEATH,K.T. Anatomical response of resistant alfafa infected with *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, v.83, p.80-85, 1993.

PENNYPACKER,B.W.; KNIEVEL,D.P.; RISIUS,M.L.; LEATH,K.T.
Photosynthetic photon flux density X pathogen interaction in growth of alfafa infected with *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, v.84, p.1350-1358, 1994.

PENNYPACKER,B.W.; KNIEVEL,D.P.; RISIUS,M.L.; LEATH,K.T. Impact of *Verticillium albo-atrum* and photosynthetic photon flux density on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in resistant alfafa. **Phytopathology**, v.85, p.132-138, 1995.

PEREZ,F.S. Teor de ergosterol do micélio de isolados de *Pisolithus tinctorius* e de *Rhizopogon* sp. Piracicaba, 1996. 48p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PETERSON,R.B.; AYLOR,D.E. Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). **Plant Physiology**, v.108, p.163-171, 1995.

PORRA,R.J.; THOMPSON,W.A.; KRIEDEMANN,P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.975, p.384-394, 1989.

PORTIS Jr.,A.R. Rubisco activase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1015, p.15-28, 1990.

PORTIS Jr., A. R. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.415-437, 1992.

- POZSÁR,B.I.; KIRÁLY,Z. Phloem-transport in rust affected plants and the cytokinin-directed long distance moviment of nutrients. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.56, p.297-309, 1966.
- RAGGI,V. CO₂ assimilation, respiration and chlorophyll fluorescence in peach leaves infected by *Taphrina deformans*. **Physiologia Plantarum**, v.93, p.540-544, 1995.
- RANTY,B.; ROBY,D.; CAVALIE,G.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ,M.T. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in melon plants infected with *Colletotrichum lagenarium*. **Planta**, v.170, p.386-391, 1987.
- RIOS,G.P. Ferrugem. In: SARTORATO,A.; RAVA,C.A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.68-84.
- ROBERTS,A.M.; WALTERS,D.R. Photosynthesis in discrete regions of leek leaves infected with the rust, *Puccinia allii* Rud. **New Phytologist**, v.110, p.371-376, 1988.
- RODRÍGUEZ,M.T.; GONZÁLEZ,M.P.; LINARES,J.M. Degradation of chlorophyll and chlorophyllase activity in senescing barley leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.129, p.369-374, 1987.
- ROSS,A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, v.14, p.340-358, 1961.
- SABATER,B.; RODRÍGUEZ,M.T. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. **Physiologia Plantarum**, v.43, p.274-276, 1978.

SAGE,R.F.; SHARKEY,T.D.; SEEMANN,J.R. The *in vivo* response of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation state and pool sizes of photosynthetic metabolites to elevated CO₂ in *Phaseolus vulgaris* L. **Planta**, v.174, p.407-416, 1988.

SAGE,R.F.; REID,C.D.; MOORE,B.; SEEMANN,J.R. Long-term kinetics of the light-dependent regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase activity in plants with and without 2-carboxyarabinitol 1-phosphate. **Planta**, v.191, p.222-230, 1993.

SALISBURY,F.B.; ROSS,C.W. **Plant Physiology**. Belmont, Wadsworth, 1992. 682p.

SALMANOWICZ,B.; NYLUND,J.E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in Scots pine. **European Journal Forest Pathology**, v.18, p.291-298, 1988.

SALVUCCI,M.E.; PORTIS Jr.,A.R.; OGREN,W.L. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulose-bisphosphate carboxylase / oxygenase activation *in vivo*. **Photosynthesis Research**, v.7, p.193-201, 1985.

SALVUCCI,M.E.; WERNEKE,J.M.; OGREN,W.L.; PORTIS Jr.,A.R. Purification and species distribution of rubisco activase. **Plant Physiology**, v.84, p.930-936, 1987.

SALVUCCI,M.E.; OGREN,W.L. The mechanism of rubisco activase: insights from studies of the properties and structure of the enzyme. **Photosynthesis Research**, v.47, p.1-11, 1996.

- SARTORATO,A. Resistência vertical e horizontal do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Isariopsis griseola* Sacc. Piracicaba, 1989. 131p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SARTORATO,A.; RAVA,C.A. Mancha angular. In: SARTORATO,A.; RAVA,C.A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.41-68.
- SARTORATO,A.; RAVA,C.A.; RIOS,G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO,S.A.; RAVA,C.A.; STONE,L.F.; ZIMMERMANN,M.J.O. (Ed.). **A cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1996. p.669-722.
- SCHOCH,S.; BROWN,J. The action of chlorophyllase on chlorophyll-protein complexes. **Journal of Physiology**, v.126, p.483-494, 1987.
- SCHOLES,J.D. Photosynthesis: cellular and tissue aspects in diseased leaves. In: AYRES,P.G. (Ed.). **Pests and Pathogens: Plant Responses to Foliar Attack**. Lancaster: Bios Scientific Publishers, 1992. p.85-106.
- SCHOLES,J.D.; FARRAR,J.F. Photosynthesis and chloroplast functioning within individual pustules of *Uromyces muscari* on bluebell leaves. **Physiological Plant Pathology**, v.27, p.387-400, 1985.
- SCHOLES,J.D.; FARRAR,J.F. Increased rates of photosynthesis in localized regions of a barley leaf infected with brown rust. **New Phytologist**, v.104, p.601-612, 1986.

- SCHOLES,J.D.; LEE,P.J.; HORTON,P.; LEWIS,D.H. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. **New Phytologist**, v.126, p.213-222, 1994.
- SCHOLES,J.D.; ROLFE,S.A. How do biotrophic pathogens affect the photosynthetic metabolism of their hosts? In: WALTERS,D.R.; SCHOLES,J.D.; BRYSON,R.J.; PAUL,N.D.; McROBERTS,N. (Ed.). **Physiological Responses of Plants to Pathogens: Aspects of Applied Biology 42**. Warwick: AAB, 1995. p.91-99.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Caracterização enzimática de fungos ectomicorrízicos e o envolvimento de enzimas celulolíticas na simbiose *Eucalyptus urophylla* - *Pisolithus tinctorius*. Piracicaba, 1997. 140p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SEEMANN,J.R.; KOBZA,J.; MOORE,B. Metabolism of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate and regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity. **Photosynthesis Research**, v.23, p.119-130, 1990.
- SEITZ,L.M.; MOHR,H.E.; BURROUGHS,R.; SAUER,D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemists**, v.54, n.6, p.1207-1217, 1977.
- SEITZ,L.M.; SAUER,D.B.; BURROUGHS,R.; MOHR,H.E.; HUBBARD,J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v.69, p.1202-1203, 1979.

SHEEN, J. Metabolic repression of transcription in higher plants. **The Plant Cell**, v.2, p.1027-1038, 1990.

SHARKEY, T.D.; SEEMANN, J.R.; BERRY, J.A. Regulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase activity in response to changing partial pressure of CO₂ and light in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.81, p.788-791, 1986.

SMART, C.M. Gene expression during leaf senescence. **New Phytologist**, v.126, p.419-448, 1994.

SO, M.L.; THROWER, L.B. The host-parasite relationships between *Vigna sesquipedalis* and *Uromyces appendiculatus*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.86, p.252-265, 1976.

SOMSSICH, I.E.; HAHLBROCK, K. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. **Trends in Plant Science**, v.3, p.86-90, 1998.

STANGARLIN, J.R. Caracterização de sítios de infecção de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.), com base nos mecanismos de defesa vegetal. Piracicaba, 1995. 93p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Phenols, β -1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turcicum* in maize genotypes. **Journal of Phytopathology**, 1999. (Submetido a publicação).

- STINTIZI,A.; HEITZ,T.; PRASAD,V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS,S.; KAUFFMAN,S.; GEOFFROY,P.; LEGRAND,M.; FRITIG,B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochemie**, v.75, p.687-706, 1993.
- SZIRÁKI,I.; MUSTÁRDY,L.A.; FALUDI-DÁNIEL,A.; KIRÁLY,Z. Alterations in chloroplast ultrastructure and chlorophyll content in rust infected pinto beans at different stages of disease development. **Phytopathology**, v.74, p.77-84, 1984.
- THOMAS,H.; BORTLIK,K.;RENTSCH,D.; SCHELLENBERG,M.; MATILE,P. Catabolism of chlorophyll *in vivo*: significance of polar chlorophyll catabolites in a non-yellowing senescence mutant of *Festuca pratensis* Huds. **New Phytologist**, v.111, p.3-8, 1989.
- Van LOON,L.C.; Van KAMMEN,A.; Polyacrylamide disc eletrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, v.40, p.199-211, 1970.
- VICENTINI,F.; HÖRTENSTEINER,S.; SCHELLENBERG,M.; THOMAS,H.; MATILE,P. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: identification of the biochemical lesion in a "stay-green" genotype of *Festuca pratensis* Huds. **New Phytologist**, v.129, p.247-252, 1995.
- VIGERS,A.J.; ROBERST,W.K.; SELITRENNIKOFF,C.P. A new family of plant antigungal proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, n.4, p.315-323, 1991.

- VOGELSANG,R.; BARZ,W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3 glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v.189, p.60-69, 1993.
- WALTERS,D.R.; AYRES,P.G. Changes in nitrogen utilization and enzyme activities associated with CO₂ exchanges in healthy leaves of powdery mildew infected barley. **Physiological Plant Pathology**, v.23, p.447-459, 1983.
- WANG,D. The nature of starch accumulation at the rust infection site in leaves of pinto bean plants. **Canadian Journal of Botany**, v.39, p.1595-1604, 1961.
- WIRTH,S.J.; WOLF,G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-105, 1990.

APÊNDICE

Apêndice 1. Preparo dos tampões para dosagem da atividade de rubisco.**a) Tampão de extração: (11 ml)**

	VOLUME ESTOQUE	ESTOQUE
100 mM Tricine (pH 8,0)	1.100 µl	1 M
20 mM KCl	440 µl	0,5 M
0,4 mM PMSF	44 µl	100 mM
2,5 mM EDTA	55 µl	0,5 M
0,8 mM benzamidina	88 µl	100 mM
4 mM ácido amino capróico	88 µl	500 mM
5 mM DTT	55 µl	1 M
H ₂ O Milli-Q	9.130 µl	-

b) Tampão atividade inicial: (3,5 ml)

100 mM Tricine (pH 8,0)	350 µl	1 M
0,6 mM RuBP	21 µl	100 mM
10 mM NaHCO ₃	175 µl	200 mM (fresco)
20 mM MgCl ₂	140 µl	500 mM
4 mM DTT	14 µl	1 M
H ₂ O Milli-Q	2.800 µl	-
C ₁₄	7 µl	-

c) Tampão de ativação: (3,0 ml)

100 mM Tricine (pH 8,0)	300 µl	1 M
20 mM NaHCO ₃	300 µl	200 mM (fresco)
40 mM MgCl ₂	240 µl	500 mM
4 mM DTT	12 µl	1 M
H ₂ O Milli-Q	2.148 µl	-

d) Tampão atividade total: (3,5 ml)

100 mM Tricine (pH 8,0)	350 µl	1 M
1,2 mM RuBP	42 µl	100 mM
10 mM NaHCO ₃	175 µl	200 mM (fresco)
4 mM DTT	14 µl	1 M
H ₂ O Milli-Q	2.919 µl	-
C ₁₄	7 µl	-

Apêndice 2. Protocolo para dosagem das atividades de β -1,3 glucanase e quitinase.

Apêndice 3. Curva padrão para a determinação de glicose através do método de Lever.

Apêndice 4. Protocolo para a dosagem de ergosterol em tecidos vegetais.

Apêndice 5. Curva padrão relacionando área de pico obtida em cromatógrafo e diferentes concentrações de ergosterol p.a. Área de pico expressa em unidade (0, 1, 2 e 3) que multiplica 10^x ($= E + x$) (onde $x = 0$ ou 6).

Apêndice 6. Curva padrão para dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando reagente concentrado e albumina de soro bovino.

Apêndice 7. Curvas padrão mostrando a relação entre o peso seco do micélio de *P. griseola* e a quantidade de ergosterol presente (A) ou a área do pico obtido em cromatógrafo (B). Barras representam o erro padrão da média. Área de pico expressa em unidade (0 a 2) que multiplica 10^x (= E + x) (onde x = 0, 4 ou 5).