

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por  
acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos,  
bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**

**Odair José Kuhn**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba  
2007**

Odair José Kuhn  
Engenheiro Agrônomo

**Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**

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

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia. Área de concentração:  
Fitopatologia

**Piracicaba  
2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Kuhn, Odair José

Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção / Odair José Kuhn . - - Piracicaba, 2007.  
140 p.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Bacillus gram-positivos 2. Bactérias patogênicas 3. Bioquímica  
4. Crestamento 5. Doenças de plantas – Controle 6. Feijão 7. Fisiologia  
8. Mofo branco 9. Resistência genética vegetal I. Título

CDD 635.652

Ao Deus Eterno, que com hábeis mãos criou a terra e tudo que nela há, a ele toda honra e toda glória pelos séculos dos séculos.

Dedico

Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas as coisas. (Rm 11.36)

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor absoluto do meu viver, Jesus, a maior honra.

A minha esposa, Arlete, mulher virtuosa, que soube ser a auxiliadora perfeita, e, com sabedoria conduziu os trabalhos nos bastidores, para que eu pudesse concluir esse desafio.

Ao meu filho, Nathan, que embora tenha pouca idade, pôde me fazer sorrir quando eu só conseguia chorar.

Aos meus pais Enio José Kuhn (*in memoriam*) e Celívia Kuhn, que me proporcionaram uma vida digna e sempre se esforçaram para o meu sucesso.

A minha irmã, Sandra, por participar comigo, muitas vezes suprindo necessidades, e principalmente por ser suporte para minha mãe, nesse período em que estive longe.

Ao professor Dr. Sérgio F. Pascholati, pela oportunidade, paciência, orientação e pelos incentivos para o meu crescimento como profissional.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, Robson Marcelo Di Piero, Leonardo de Souza Cavalcanti, Solange Maria Bonaldo, Patrícia Cia, Ricardo Ferrari Silva, Maurício Batista Fialho, Nívea Maria Tonucci Zanardo, Leonardo Toffano, André Boldrin Beltrame, Maria Cristina Canale Rappussi da Silva, Marizete de Fátima Pimentel Godoy, Danilo Tadashi Tagami Kamimura, Dirceu Macagnan, Marisa S. A. Renaud Faulin, Ely Oliveira Garcia e Silvia Blumer, que tiveram participação direta no meu aprendizado.

A Vanildo Heleno Pereira, Roberto Luiz Portz, Rubens Mariano de Oliveira Junior e Paulo Roberto Ferreira da Silva, Alfredo Richart, Bruno Carneiro Pedreira, Mauro Guida dos Santos, Rafael Vasconcelos Ribeiro e Sandra Cristina Vigo Schultz pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. Reginaldo da Silva Romeiro, Dra. Sylvia Dias Guzzo, Dra. Margarida F. Ito, Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, Dr. José Renato Stangarlin, Dr. Carlos Guilherme Silveira Pedreira, Dr. Luiz Fernandes Razera e Dra. Solange Guidolin Canniatti Brazaca pelo fornecimento de material e/ou equipamentos para a realização da pesquisa.

Aos funcionários Edivaldo, Heloísa, Fernanda, Jéferson, Liliane, Linda, Marize, Pedro, Rodolfo e Sylvia, que participaram de alguma forma em atividades referentes a esta tese.

Ao meu tio e amigo João Batista Conrat, que despertou em mim o desejo de estudar e sempre me estimulou. Fica aqui o meu reconhecimento.

A todos os professores do setor de Fitopatologia da Esalq, que souberam ensinar muito mais do que apenas técnicas, mas também respeito e humildade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que de uma forma ou de outra participaram da realização desta obra.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Aspectos da indução de resistência a patógenos e da cultura.....	17
2.1.1 Indução de resistência.....	17
2.1.1.1 Pré-condicionamento ( <i>Priming</i> ).....	20
2.1.2 Custo da resistência induzida.....	22
2.1.2.1 Mensuração dos custos.....	23
2.1.2.2 Origem dos custos.....	25
2.1.3 Autotoxidade .....	30
2.1.4 Custo Ecológico.....	30
2.1.4.1 Efeito sobre insetos polinizadores .....	32
2.1.4.2 Efeito sobre as simbioses micorrízicas e rizóbio-leguminosa.....	32
2.1.5 Crescimento e produtividade de plantas induzidas .....	35
2.1.5.1 Dependência da dose do indutor.....	35
2.1.5.2 Dependência da condição nutricional.....	37
2.1.5.3 Dependência da interação biológica.....	39
2.1.6 Enzimas envolvidas na indução de resistência .....	41
2.1.6.1 Peroxidases.....	41
2.1.6.2 Polifenoloxidasas.....	44
2.1.6.3 Fenilalanina amônia-liases .....	47
2.1.6.4 Quitinases e $\beta$ -1,3-Glucanases .....	49
2.1.7 Cultura do feijoeiro .....	52
2.1.7.1 Resistência induzida em feijoeiro .....	53
2.1.8 Crestamento bacteriano comum.....	55
2.1.8.1 Sintomas .....	56
2.1.8.2 Etiologia.....	56
2.1.8.3 Controle.....	57
2.1.9 O mofo branco.....	57
2.1.9.1 Sintomas .....	57
2.1.9.2 Etiologia.....	58
2.1.9.3 Controle.....	58
2.2 Material e métodos.....	59
2.2.1 Obtenção e manutenção dos microrganismos .....	59
2.2.2 Produção das plantas em casa de vegetação.....	59
2.2.2.1 Cultivo em casa de vegetação com aplicação dos indutores .....	59
2.2.3 Cultivo a campo.....	60
2.2.4 Avaliação de doença .....	60
2.2.5 Análises bioquímicas e fisiológicas .....	61
2.2.5.1 Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar .....	61
2.2.5.2 Fenóis totais .....	61

2.2.5.3	Lignina .....	61
2.2.5.4	Obtenção dos extratos protéicos .....	62
2.2.5.5	Atividade de peroxidase.....	62
2.2.5.6	Atividade de quitinase.....	63
2.2.5.7	Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase.....	63
2.2.5.8	Atividade de polifenoxidase.....	64
2.2.5.9	Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	64
2.2.5.10	Atividade de proteases .....	65
2.2.5.11	Proteínas totais .....	65
2.2.5.12	Açúcares redutores.....	65
2.2.5.13	Respiração e fotossíntese .....	66
2.2.6	Parâmetros de produção e qualidade de grãos .....	66
2.3	Resultados.....	67
2.3.1	Avaliação da severidade do crestamento bacteriano.....	67
2.3.2	Avaliação da severidade do mofo branco no campo .....	68
2.3.3	Atividade de enzimas relacionadas a indução de resistência .....	69
2.3.3.1	Peroxidase .....	69
2.3.3.2	Quitinase.....	71
2.3.3.3	$\beta$ -1,3-Glucanases.....	73
2.3.3.4	Fenilalanina amônia-liase .....	75
2.3.3.5	Polifenoxidases .....	76
2.3.4	Atividade de protease .....	77
2.3.5	Aspectos fisiológicos.....	79
2.3.5.1	Fotossíntese .....	79
2.3.5.2	Respiração.....	82
2.3.6	Síntese de compostos de defesa celular .....	85
2.3.6.1	Fenóis totais.....	85
2.3.6.2	Lignina .....	87
2.3.7	Teor de compostos do metabolismo primário no tecido foliar .....	88
2.3.7.1	Proteína .....	88
2.3.7.2	Açúcares redutores.....	90
2.3.8	Produção .....	92
2.3.8.1	Massa seca das plantas .....	92
2.3.8.2	Produtividade e parâmetros de produção .....	93
2.3.9	Qualidade .....	95
2.4	Discussão .....	96
2.4.1	Avaliação da severidade do crestamento bacteriano.....	97
2.4.2	Avaliação da severidade do mofo branco no campo .....	98
2.4.3	Atividade de enzimas relacionadas a indução de resistência .....	99
2.4.4	Atividade de protease .....	102
2.4.5	Aspectos fisiológicos.....	102
2.4.5.1	Respiração.....	102
2.4.5.2	Fotossíntese .....	103
2.4.6	Síntese de compostos de defesa celular .....	105
2.4.6.1	Fenóis totais.....	105
2.4.6.2	Lignina .....	106
2.4.7	Teor de compostos primários no tecido foliar .....	107



2.4.7.1	Proteína.....	107
2.4.7.2	Açúcares redutores .....	107
2.4.8	Produção .....	108
2.4.8.1	Massa seca das plantas .....	108
2.4.8.2	Produtividade, parâmetros de produção e qualidade .....	110
3	CONCLUSÕES .....	113
	REFERÊNCIAS.....	115

## RESUMO

### **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. As plantas apresentam sistema de defesa induzível, com a finalidade de economizar energia. Desse modo, a resistência induzida em condições naturais representará custo apenas na presença do patógeno. Porém, plantas que investem seus recursos para se defenderem na ausência de patógenos arcarão com custos que refletirão na produtividade, uma vez que as alterações metabólicas que levam a resistência apresentam custo adaptativo associado, o qual pode pesar mais do que o benefício. O efeito negativo na produtividade ocorre principalmente onde indutores químicos são utilizados repetidas vezes ou em doses mais elevadas. Assim, em alguns casos podemos estar caminhando sobre uma estreita linha entre custo e benefício, onde a cura pode ser tão ruim quanto a própria doença. Neste trabalho foram conduzidos experimentos objetivando verificar alterações bioquímicas e fisiológicas, correlacionando-as com parâmetros de produção do feijoeiro entre a indução mediada por acibenzolar-S-metil (ASM), indutor químico, e, a mediada por *Bacillus cereus*, indutor biológico, antes da chegada do patógeno. Para tanto, foram avaliados plantas de feijão, induzidas por esses dois indutores e desafiadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, para constatar a ocorrência do fenômeno da indução de resistência. Na ausência do patógeno, foram avaliados os parâmetros fisiológicos respiração e fotossíntese, determinada a atividade de enzimas envolvidas no processo de defesa como peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase e a atividade de enzimas envolvidas no catabolismo como proteases, a síntese de compostos do metabolismo secundário como fenóis totais e lignina, a síntese de compostos do metabolismo primário como proteínas e açúcares redutores. Também se avaliou o crescimento das plantas, a produtividade e parâmetros de produção e alguns parâmetros de qualidade dos grãos. Observou-se a ocorrência da indução de resistência em função da aplicação dos dois indutores utilizados, porém para o indutor ASM a indução de resistência estava associada a aumentos na atividade de peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase e proteases, aumento da síntese de lignina e redução no teor de fenóis, aumentos no teor de proteínas solúveis e de açúcares redutores nas folhas, redução do crescimento e da produtividade, aumento do teor de proteína dos grãos e redução do teor de amido nestes. Já o *B. cereus* apenas ocasionou aumento na atividade de peroxidase de forma atenuada e tendeu a aumentar a atividade de proteases, e reduzir o teor de proteínas nas folhas sem interferir no crescimento ou na produtividade, mas reduziu o teor de proteína dos grãos, mas aumentou o teor de amido nestes. Portanto, o indutor *B. cereus*, aparentemente alterou muito pouco o metabolismo do feijoeiro, sem interferir na produtividade e melhorando a qualidade da produção, enquanto que o indutor abiótico ASM alterou muito mais seu metabolismo, gerando um custo metabólico e redirecionando os fotoassimilados para investir em defesas, a custo da redução da produtividade.

Palavras chave: Indução de resistência; Custo adaptativo; Fisiologia; Bioquímica; *Phaseolus vulgaris*; Acibenzolar-S-metil; *Bacillus cereus*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Sclerotinia sclerotiorum*

## ABSTRACT

### **Resistance induced in bean plants (*Phaseolus vulgaris*) by acibenzolar-S-methyl and *Bacillus cereus*: physiological and biochemical aspects, growth and production parameters**

The induction of systemic resistance involves the activation of latent resistance mechanisms in plants against pathogens in response to the treatment with biotic or abiotic agents. The plants present latent defense system that can be activated with the goal of saving energy. Thus, the induced resistance under natural conditions will represent cost only in the pathogen presence. In this way, plants that invest their resources to defend themselves in the absence of the pathogen will pay off with costs that will reflect in productivity, since the metabolic changes that led to resistance have associated fitness cost which could outweigh the benefit. The negative effects on plant productivity usually occur when chemical inducers are used repeatedly or in higher doses, mainly in the absence of the pathogen. Thus, we can say that in some cases we can be walking on a fine line between cost and benefit, where the cure may be as bad as the disease itself. In this work, experiments were carry out to verify biochemical and physiologic alterations, correlating them with production parameters of bean plants treated with acibenzolar-S-methyl (ASM), chemical inducer, or *Bacillus cereus*, biological inducer, before the pathogen arrival. Initially, bean plants were evaluated for induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* when treated with the two inducers. In the absence of the pathogen, it was evaluated the physiological parameters respiration and photosynthesis and the activity of enzymes involved in the defense as peroxidase, chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase and polifenoxidase and activity of enzymes involved in the catabolism as proteases, and the synthesis of compounds of the secondary metabolism as phenols and lignin, and the synthesis of compounds of the primary metabolism as proteins and sugars. The growth of the plants was evaluated as well as their productivity and production parameters. Some quality parameters of the grains were also evaluated. The occurrence of the resistance induced in the bean plants against the pathogens was observed for the two inducers. However, for the ASM the resistance induced was associated to increases in peroxidase, chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities, increase in the protease activity, increase in lignin synthesis and reduction in the phenol content, increase in soluble proteins and sugar content in the leaves, reduction of the growth and productivity, increasing the protein and reducing the starch content of the grains. The *B. cereus* only increased peroxidase activity in a lower way and showed a tendency to increase protease activity, and to reduce the protein content in the leaves without interfering in the growth or in the productivity, but it reduced the protein content and it increased the starch content of the grains. Therefore, the biotic inducer, *B. cereus* altered a minimum the metabolism of the bean plant, without interfering in the productivity and improving the quality of the production, while the abiotic inducer ASM altered its metabolism, generating a metabolic cost and consuming the plant photosyntathes to invest in defenses, causing a reduction in the productivity.

Keywords: Induced resistance; Fitness costs; Physiology; Biochemistry; *Phaseolus vulgaris*; Acibenzolar-S-methyl; *Bacillus cereus*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*; *Sclerotinia sclerotiorum*

## 1 INTRODUÇÃO

“Em alguns casos podemos estar caminhando sobre uma estreita linha entre custo e benefício, onde a cura pode ser tão ruim quanto a própria doença.”

Richard M. Bostock, 2005

O controle de doenças de plantas é o objetivo prático mais importante da fitopatologia, daí o grande investimento em pesquisa e desenvolvimento de produtos e técnicas que se propõem a cumprir esse objetivo. No entanto, na ânsia de grandes produtividades com técnicas práticas de fácil uso e alta eficiência, os fungicidas passaram a ser largamente utilizados ao custo de grande impacto ambiental. Porém, no final do século passado as pesquisas se intensificaram no uso de resistência por parte da planta, não apenas a resistência genética a partir de genes introduzidos, mas também a resistência induzida, fenômeno que empolgou muitos pesquisadores, os quais vislumbraram a utilização de defesas latentes das plantas cultivadas, a partir de agentes indutores, bióticos ou abióticos, com baixo impacto ambiental, e com a possibilidade de se utilizar a mesma tecnologia de aplicação usada para os fungicidas.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos e a eficiência da indução de resistência foi mais que provada, no entanto, poucos pesquisadores se preocuparam com a produtividade das culturas em meio a esse fenômeno. Por outro lado, as plantas apresentam um sistema de defesa latente, com a finalidade de economizar energia e substrato, que pode ser ativado com a chegada do patógeno, ao contrário da resistência constitutiva, que representa um custo real para a planta, uma vez que independente da presença do patógeno esta investe seus limitados recursos na produção de defesas. Na presença do patógeno, o investimento em defesa deve valer a pena e as plantas induzidas serem beneficiadas. Dessa maneira, a resistência induzida em condições naturais representará custo apenas na presença do patógeno, e, mesmo com a chegada deste, há uma compensação pelo atraso temporal na expressão da defesa, alocando recursos para este propósito somente quando necessários. Porém, plantas que investem seus limitados recursos para se defenderem na ausência de patógenos arcarão com custos que refletirão na produtividade, uma vez que, as

alterações metabólicas que levam a resistência possuem um custo adaptativo associado, o qual pode pesar mais do que o benefício.

Em algumas pesquisas tem-se observado um ganho de produtividade, fato que nos indica um custo menor do que o benefício, porém, na maioria dos casos, não há incrementos na produtividade, ou até em alguns casos há redução da produtividade, mesmo com drástica redução da doença. Nesta última condição, quais são os princípios que regem este acontecimento? Será que a expressão da defesa pode reduzir a produtividade, a ponto de ser o custo maior do que o benefício? E em que condição isso pode acontecer? Será que existem diferenças entre indutores bióticos e abióticos? Estas são perguntas que precisam ser respondidas para se redirecionar as pesquisas e o uso desta tecnologia.

Neste trabalho foram conduzidos experimentos objetivando verificar alterações bioquímicas e fisiológicas, correlacionando-as com parâmetros de produção do feijoeiro entre a indução mediada por acibenzolar-S-metil, um indutor químico, e, a mediada por *Bacillus cereus*, um indutor biológico, antes da chegada do patógeno.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Aspectos da indução de resistência a patógenos e da cultura**

#### **2.1.1 Indução de resistência**

Toda planta na natureza se desenvolve sob constante ameaça de seus inimigos, sejam eles herbívoros ou patógenos. Todavia, as plantas não aceitam passivamente a agressão por parte de seus inimigos, mas apresentam barreiras já existentes antes do ataque, que visam conter esta agressão. Estas barreiras são denominadas de defesas constitutivas e são representadas por estruturas, como: ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, bem como substâncias químicas pré-formadas, como os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995). Por outro lado, há mecanismos de defesa que se manifestam somente quando a planta é desafiada por um agressor. Estes mecanismos envolvem a formação de papila, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, além de compostos como fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) e espécies reativas de oxigênio (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997). O termo indução de resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também pode indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta a distância do local de aplicação do indutor (MORAES, 1992). Os agentes indutores de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas são chamados de elicitores (SMITH, 1996), podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999).



A ativação das defesas das plantas pode ocorrer a partir da elicitação por compostos presentes em extratos de plantas (BETTIOL; STADNIK, 2001; DAAYF; SCHMITT; BELANGER, 1995; KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS; SCHMITT, 1998; SINGH; PRITHIVIRAJ, 1997; STANGARLIN, et al., 1999;), preparações de leveduras (PASCHOLATI, 1998; STADNIK; BETTIOL, 2000), exopolissacarídeos bacterianos (BACH; BARROS; KIMATI, 2003; CASTRO; BACH, 2004), rizobactérias promotoras de crescimento (KEHLENBECK; SCHÖNBECK, 1995; MURPHY et al., 2000; NANDAKUMAR et al., 2001; ONGENA et al., 1999; VIDHYASEKARAN et al., 2001; VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002), fungos promotores de crescimento (MADI; KATAN, 1998), e ainda raças não virulentas do patógeno (MONOT et al., 2002; SHIRAISHI et al., 1995; SMEDEGAARD-PETERSEN; STØLEN, 1981;), além do próprio patógeno inativado pelo calor (BACH; BARROS; KIMATI, 2003). Pode-se ainda utilizar elicitores químicos ou físicos, como silício (Si) (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER, 1994), ácido salicílico (AS) (BESSER et al., 2000; CIPOLLINI, 2002; HWANG et al., 1997; MANANDHAR et al., 1998), ácido D-L-aminobutírico (BABA) (COHEN; GISI; MÖSINGER, 1991; HWANG et al., 1997; ZIMMERLI et al., 2000), quitosana (SATHIYABAMA; BALASUBRAMANIAN, 1998), cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico (BÉCOT et al., 2000; MANANDHAR et al., 1998), acibenzolar-S-metil (ASM) (BESSER et al., 2000; BOKSHI; MORRIS; DEVERALL, 2003; COLE, 1999; COOLS; ISHII, 2002; DANN et al., 1998; DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2004; 2005; GEETHA; SHETTY, 2002; GODARD et al., 1999; HEIL et al., 2000; IRITI; FAORO, 2003a, b; KATZ; THULKE; CONRATH, 1998; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; LOUWS et al., 2001; SOARES; MARINGONI, 2002;), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) (BESSER et al., 2000; DANN et al., 1998), fosfato de potássio monobásico (REUVENI et al., 2000), ácido jasmônico (AJ) (BALDWIN, 1998; CIPOLLINI, 2002; REDMAN; CIPOLLINI JUNIOR; SCHULTZ, 2001), metil jasmonato (MeJa) (HEIJARI et al., 2004, VAN DAM; BALDWIN, 2001), sacarina (BOYLE; WALTRERS, 2005a, b), ácidos graxos (COHEN; GISI; MÖSINGER, 1991; COQUOZ et al., 1995) ou luz em comprimentos de onda específicos (KHANAM et al., 2005).

Portanto, a resistência induzida consiste no aumento da resistência por meio da utilização de agentes externos, sem qualquer alteração no genoma da planta

(STADNIK, 2000), isso ocorrendo de maneira não específica por meio da ativação de genes envolvidos em diversas respostas de defesa, tais como explosões oxidativas (LAMB; DIXON, 1997), respostas de hipersensibilidade (ZIMMERLI et al., 2000), acúmulo de proteínas-RP (por exemplo, peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases) (BACH; BARROS; KIMATI, 2003; BAYSAL; SOYLU; SOYLU, 2003; BUZI et al., 2004; CABELO; CHILOSI; TENA, 1994; DALISAY; KUĆ, 1995; DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2004; HWANG et al., 1997; NANDAKUMAR et al., 2001; STADNIK; BUCHENAUER, 2000; VIDHYASEKARAN et al., 2001; XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998), síntese de inibidores de proteinases (IP) (ZAVALA et al., 2004), enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL), chalcona isomerase (CHI), chalcona sintase (CHS) (CAMPOS et al., 2003; COOLS; ISHII, 2002; KIM et al., 2001; KOHLER; SCHWINDLING; CONRATH, 2002; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; SCHNEIDER; ULLRICH, 1994; SHIRAISHI et al., 1995; SINGH; PRITHIVIRAJ, 1997; STADNIK; BUCHENAUER, 2000; VIDHYASEKARAN et al., 2001; WEN et al., 2005), cinamil álcool desidrogenase (CAD) (GONZÁLEZ; POLANCO; RUIZ, 2000; STADNIK; BUCHENAUER, 2000), polifenoloxidase (PFO) (THALER et al., 2001) e enzimas envolvidas na peroxidação de lipídios, como a lipoxigenase (LOX) (BUZI et al., 2004), síntese de fitoalexinas (LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001; SALES et al., 2002), acúmulo de compostos fenólicos (CHÉRIF; ASSELIN; BÉLANGER, 1994; HAMMERSCHMIDT, 2005b, c; ONGENA et al., 1999; SIEGRIST; JEBLICK; KAUSS, 1994; STADNIK; BUCHENAUER, 2000;), aumentos na atividade de  $\beta$ -1,3-glucana sintase e conseqüente aumento na formação de calose (SCHMELE; KAUSS, 1990; ZIMMERLI et al., 2000), formação de papila (BESSER et al., 2000; STADNIK; BUCHENAUER, 2000), bem como o acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do microrganismo (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; COHEN; GISI; MÖSINGER, 1991; HAMMERSCHMIDT; KUĆ, 1982).

Em função da rota de sinalização que leva a expressão das defesas, a indução de resistência pode ser dividida em resistência induzida por microrganismos patogênicos que tem o AS como principal sinalizador, levando a expressão principalmente de proteínas-RP, sendo designada de resistência sistêmica adquirida ou SAR (do inglês – *systemic acquired resistance*) (MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998;

RYALS et al., 1996), e resistência induzida por rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR, do inglês - *plant growth promoting rhizobacteria*) que é conhecida por resistência sistêmica induzida ou ISR (do inglês – *induced systemic resistance*), cujos principais sinalizadores são AJ e etileno (ET) e independe do AS (BOSTOCK, 1999; BOSTOCK, 2005; PIETERSE et al., 1998; PIETERSE et al., 2001). De qualquer maneira, independentemente do agente biótico indutor, a comunicação cruzada entre as diferentes rotas já foi demonstrada (PIETERSE et al., 2005). Portanto, para se evitar confusões, alguns autores preferem o uso do termo geral indução de resistência (HAMMERSCHMIDT; MÉTRAUX; VAN LOON, 2001).

#### **2.1.1.1 Pré-condicionamento (*Priming*)**

O pré-condicionamento é um importante componente da resistência sistêmica induzida (COOLS; ISHII, 2002) e está associado ao aumento da capacidade para uma rápida e efetiva ativação das respostas de defesa celular, as quais são induzidas somente após o contato com o patógeno desafiante (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002). Quando a planta é induzida pela presença de um elicitor, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada à uma planta induzida com o mesmo elicitor e posteriormente desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno.

A presença do patógeno, após a indução, altera a magnitude dos eventos bioquímicos, bem como, promove o acionamento de outros mecanismos, enquanto que, plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno apresentam menor magnitude desses eventos bioquímicos. Dessa forma, quando plantas são pré-inoculadas com um microrganismo ou tratadas com indutores abióticos de resistência sistêmica, embora pouco se observe em termos de alterações bioquímicas, a planta sistemicamente protegida reage de forma mais rápida e eficientemente ao desafio com um patógeno virulento (HEIL; BOSTOCK, 2002; STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX et al., 1997).

O fenômeno não é explicado unicamente pela expressão dos mecanismos de defesa, mas pelo aumento da sensibilidade da planta em perceber a chegada de um

patógeno em potencial. O que chama a atenção neste caso é a ocorrência de um aumento da resistência em plantas suscetíveis na ausência de um sistema de reconhecimento patógeno-específico baseado em genes R do hospedeiro (HAMMERSCHMIDT, 1999; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001). Por exemplo, Cools e Ishii (2002) demonstraram que plantas de pepino induzidas com ASM expressaram genes de peroxidase e de proteínas-RP, mas que não havia a expressão de genes que codificavam para a FAL. Porém, quando as plantas foram desafiadas com *Colletotrichum orbiculare*, após a indução foram observados aumentos no nível da peroxidase e proteínas-RP, bem como na expressão da FAL, em magnitude superior às plantas não tratadas e inoculadas. Siegrist; Jeblick e Kauss (1994) observaram que plantas de pepino induzidas com AS, INA ou ácido 5-clorosalicílico (A5CS) exibiam aumentos na concentração de compostos fenólicos e quitinases somente após o desafio com *Colletotrichum lagenarium*, levando os autores a sugerir que os elicitores aumentavam a percepção da presença do patógeno, conduzindo a expressão de diversas respostas de defesa. Nesse contexto, Latunde-Dada e Lucas (2001) induziram resistência em caupi com ASM através do tratamento de sementes e avaliaram o comportamento da FAL e CHI em plântulas, enzimas importantes da rota de síntese de fitoalexinas, bem como a produção das fitoalexinas kievitona e faseolidina. Interessantemente, em plântulas tratadas com ASM, a expressão das enzimas e a formação das fitoalexinas não ocorreu, porém, após o desafio com *Colletotrichum destructivum*, houve aumento da atividade da FAL, 18 horas após o desafio e CHI após 25 horas, além de aumentos na concentração das fitoalexinas em relação as plantas não tratadas e inoculadas. Nandakumar et al. (2001) induziram resistência em arroz com dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* com e sem o desafio com *Rhizoctonia solani*, e observaram que na presença das bactérias indutoras houve um pequeno aumento na atividade de peroxidases e quitinases, que se mantinha constante, devido a presença do indutor biótico. Quando as plantas foram desafiadas com o patógeno, a planta pré-condicionada aumentava ainda mais a atividade destas enzimas, dificultando a colonização dos tecidos por *R. solani*.

Outro aspecto interessante é o fato da via de sinalização da ISR estar mais relacionada ao pré-condicionamento, sendo mínimo o número de genes alterados antes

da chegada do patógeno (VERHAGEN et al., 2004), enquanto que a via de sinalização da SAR está mais relacionada à expressão direta de mecanismos de defesa (LAWTON et al., 1995; MALECK et al., 2000). Finalmente, embora não se conheça a base molecular para se explicar a maior sensibilidade das plantas (HAMMERSCHMIDT, 1999; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2001), a transcrição de genes envolvidos na percepção do patógeno, transdução de sinais, modificação da parede celular, metabolismo secundário e de ácidos graxos, pode ser o processo chave associado com o estado de pré-condicionamento sistemicamente ativado (SHENK et al., 2003).

### **2.1.2 Custo da resistência induzida**

A alocação de recursos internos da planta para o crescimento ou defesa é determinado pela competição por substrato comum e energia, sendo que a planta deve balancear os investimentos nesses processos (GAYLER et al., 2004; HERMS; MATTSON, 1992). Toda alocação de recursos para defesa pode ser considerado como custo geral, porém, este custo é dividido entre defesas constitutivas e induzíveis. O custo da resistência induzida é definido por Heil e Baldwin (2002), como todo efeito negativo sobre a adaptabilidade da planta que resulta da expressão de características de defesa quando a planta cresce sob condições evolucionariamente relevantes, sendo que nessa condição, é preciso considerar não apenas a elevação dos custos dos processos internos, como alocação de carbono e autotoxicidade, mas também os custos ecológicos, que envolvem alterações no relacionamento com organismos benéficos ou maléficos.

As plantas, do ponto de vista evolucionário, desenvolveram um sistema de defesa latente, com a finalidade de economizar energia e substrato, que pode ser ativado com a chegada do patógeno, ao contrário da resistência constitutiva, que representa um custo real para a planta, uma vez que independente da presença do patógeno esta investe seus limitados recursos na defesa. De acordo com a hipótese de alocação de recursos, é previsto que, quando os patógenos estão presentes o investimento em defesa deve valer a pena e as plantas induzidas serem beneficiadas (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985). Dessa maneira, a resistência induzida em condições naturais representará custo apenas na presença do patógeno (HEIL, 2002), e,

mesmo com a chegada deste, há uma compensação pelo atraso temporal na expressão da defesa, alocando recursos para este propósito somente quando necessários (BOSTOCK, 2005). Porém, plantas que investem seus recursos para se defenderem na ausência de patógenos arcarão com custos que refletirão na produtividade, uma vez que, as alterações metabólicas que levam a resistência têm um custo adaptativo associado, o qual pode pesar mais do que o benefício (IRITI; FAORO, 2003b).

### **2.1.2.1 Mensuração dos custos**

Na natureza as plantas são expostas a variações ambientais que as forçam a se adaptarem através de alterações na atividade transcricional de diversos genes (SUZUKI et al., 2006). Dessa maneira, o custo da indução de resistência é difícil de ser mensurado, pois seria necessário um hospedeiro suscetível no estado inteiramente não induzido (PURINGTON, 2000). Porém, quando uma plântula começa a interagir com o ambiente que a rodeia, genes começam a ser ativados em função deste ambiente. Um claro exemplo está no trabalho de Sahashi; Tsuji e Shishiyama (1989), onde se demonstrou que plantas de cevada crescidas em ambiente livre de microrganismos exibiram aumento da suscetibilidade ao oídio, levando os autores a sugerir que na natureza a resistência pode ser induzida pela interação das plantas com os microrganismos que as circundam. Dessa forma, as plantas sempre estarão pelo menos em um estado intermediário de indução (HATCHER; PAUL, 2000), assunto este abordado na revisão de Walters e Boyle (2005).

Devido à dificuldade de se mensurar os custos totais das defesas induzidas, pesquisadores tem determinado apenas os custos de um indutor específico entre plantas induzidas ou não (PURINGTON, 2000). Isto faz com que surjam erros quando se comparam os resultados de diferentes pesquisadores, observando-se assim resultados contraditórios, como os enumerados por Walters e Boyle (2005). Divergências podem ser geradas quando se comparam espécies ou variedades diferentes de plantas (DANN et al. 1998; KONSTANTINIDOU-DOLSTINI; SCHMIDT, 1998;), bem como variações ambientais (DIETRICH; PLOSS; HEIL, 2005; HEIL et al., 2000). A influência da variação ambiental foi claramente demonstrada por Dietrich; Ploss e Heil (2005), os quais aplicaram ASM em *Arabidopsis* cultivado em diferentes

condições de fornecimento de água e nitrogênio e por Heil et al. (2000), os quais, trabalhando com trigo, observaram que o custo é dependente do fornecimento de nitrogênio, bem como do estágio fenológico em que as plantas são induzidas. Portanto, variações sutis no planejamento experimental e no indutor usado, associado com a variação entre diferentes interações planta/patógeno e o uso de alta densidade de inóculo, podem influenciar profundamente o resultado e a interpretação deste (BOSTOCK, 2005). Dessa forma, para se comparar diferentes sistemas e se extrapolar para as condições naturais, deve-se considerar a concentração do elicitor, o método de aplicação, a ausência de outros elicitores que possam estar presentes em fluidos extracelulares do microrganismo desafiante, a espécie da planta hospedeira e o estágio de crescimento da mesma (BOSTOCK, 2005).

Outra consideração importante é a separação entre o estado de pré-condicionamento e os mecanismos de resistência ativados após o desafio com o patógeno. No primeiro caso, supõe-se ser a alocação de recursos menor, visto que a expressão dos mecanismos de defesa é menor (COOLS; ISHII, 2002) ou inexistente (LATUNDE-DADA; LUCAS 2001; SIEGRIST; JEBLICK; KAUSS 1994), resumindo-se a possível expressão de genes ligados ao pré-condicionamento da planta hospedeira. E assim, se forem avaliados os custos apenas na ausência do patógeno, o resultado será subestimado (HAMMERSCHMIDT, 2005a) ou específico do pré-condicionamento. Portanto, para se mensurar o custo após o desafio e assim se ter uma completa indução é preciso considerar também que a presença do patógeno colonizando os tecidos causa dano a este, e essa perda não pode ser computada como custo. Para contornar este problema, Walters e Boyle (2005) sugerem a inoculação do patógeno desafiante na planta, deixando-o tempo suficiente para desencadear as reações de defesa e antes que este passe a ter relações parasitárias estáveis e cause conseqüente dano ao tecido, seja controlado com fungicida, por exemplo, se o patógeno for um fungo, dois a três dias após o desafio.

Na mensuração dos custos, Gayler et al. (2004) propuseram um modelo de comparação entre custo e benefício em função da alocação de recursos para a produção de compostos de defesa em plantas jovens de macieira, mostrando que sua

produção é dispendiosa e ocorre às custas da redução no crescimento da planta (Figura 1).

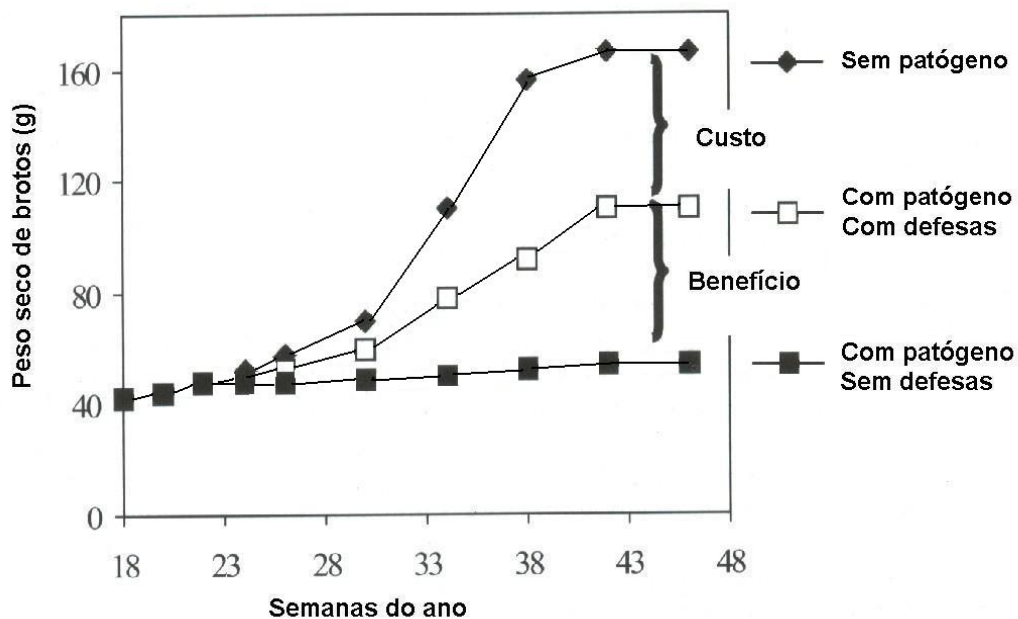


Figura 1 - Relação custo/benefício proposta por Gayler et al. (2004), adaptado de Treutter (2005), com base na produção de compostos de defesa em macieiras jovens

### 2.1.2.2 Origem dos custos

A diferença de custos pode estar associada à ativação de diferentes rotas sinalizadoras. Cada rota pode ser ativada separadamente por elicitores específicos (PIETERSE et al., 2005; VAN WEES et al., 1999), sendo que cada uma induzirá a expressão de um conjunto específico de genes. Por exemplo, AS controla a indução de genes que codificam proteínas-RP da família PR1 (atividade antiomicetos e antifúngica), PR2 ( $\beta$ -1,3-glucanases) e PR5 (proteínas tipo taumatina, exibindo atividade antifúngica) (UKNES et al., 1992); o etileno está envolvido na expressão de genes *HeI* induzíveis por patógenos e que codificam proteínas do tipo heveína (POTTER et al., 1993), gene *ChiB* que codifica uma quitinase básica (SAMAC et al., 1990) e *Pdf1.2* que codifica uma defensina de planta (PENNINCKX et al., 1996); o ácido jasmônico é responsável pela indução dos genes *Lox1* e *Lox2* que codificam para duas lipoxigenases (BELL; MULLET,



1993; MELAN et al., 1993) e pela indução de *Pal1* que codifica para FAL e que controla a síntese dos fenilpropanóides (MAUCH-MANI; SLUSARENKO, 1996), *Pin* que codifica um inibidor de proteinase (FARMER; RYAN, 1992), genes *Atvsp* que codificam proteínas vegetativas de reserva em *Arabidopsis*, além de também induzir os genes *Hel*, *ChiB* e *Pdf1.2*. Obviamente, a expressão de cada um desses gene representa um custo energético para a planta (HEIL, 2001).

No conjunto de genes expressos, podem estar genes não relacionados à defesa (HEIL; BALDWIN, 2002). Nesse contexto, Guzzo (2004) observou em cafeeiro cv. Mundo Novo, induzido com ASM, a expressão adicional de 302 genes, dos quais 44% não apresentaram similaridade com genes depositados no GenBank, 10% foram similares a proteínas hipotéticas de função desconhecida, 30% representavam genes associados a manutenção celular e desenvolvimento vegetal, enquanto que apenas 16% referiam-se a genes envolvidos com mecanismos de resistência. Quando a autora inoculou o patógeno *Hemileia vastatrix* em um híbrido resistente, 297 genes foram expressos adicionalmente, dos quais 36% não apresentaram nenhuma similaridade com outros genes, 12% eram hipotéticos, 30% estavam envolvidos na manutenção celular e 22% relacionados a mecanismos de resistência. Por sua vez, Desikan et al. (2001), usando plantas de *Arabidopsis* infiltradas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observaram a expressão diferencial de 175 genes, dos quais 113 aumentaram e 62 foram reprimidos. Dos 113 genes estimulados, 34 % eram desconhecidos, 12% faziam parte do metabolismo celular, 1% eram genes envolvidos no transporte de energia, 18% envolvidos na transcrição, 3% envolvidos no transporte de proteínas, 8% na organização e ciclo celular, 6% na transdução de sinais e apenas 18% envolvidos diretamente na defesa.

Além do custo associado a uma única rota sinalizadora, podem ocorrer interações entre rotas. Como exemplo, para a completa expressão do gene *Pdf1.2* há necessidade de ativação das rotas do ET e AJ em conjunto (VAN WEES et al., 1999). Penninckx et al. (1998) mostraram que o etileno atua em sinergismo com AJ para elicitar genes de defesa em *Arabidopsis* e Xu et al. (1994) observaram o mesmo em plantas de fumo. Já a interação entre AJ e AS apresenta efeito aditivo na resistência induzida por rizobactérias em *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (VAN WEES et al., 2000). No entanto, é comum encontrar na literatura trabalhos onde

AS ou seus análogos diminuem a ação do AJ (BALDWIN; SCHMELZ; ZHANG, 1996; BALDWIN et al., 1997; HEIL; BOSTOCK, 2002; VAN WEES et al., 1999), sendo que esse antagonismo pode ocorrer principalmente quando duas rotas metabólicas que desencadeiam defesas contra diferentes invasores, competem por um mesmo precursor bioquímico (STRAUSS et al., 2002). Todavia, as plantas são capazes de sustentar simultaneamente genes induzidos por AJ e AS (BOSTOCK, 2005).

Toda expressão gênica demanda energia para que os eventos metabólicos sejam concretizados. Nesse sentido, o processo de respiração deve ser intensificado para que haja energia suficiente. O aumento da respiração foi observado por Smedegaard-Petersen e Stølen (1981) em plantas de cevada que expressaram resistência contra um isolado de *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, enquanto que Chen; Su e Kao (2004) observaram aumento da respiração correlacionado com redução do teor de sacarose e glicose em folhas de arroz induzidas com AJ. Assim, o resultado pode ser positivo quando o benefício for maior que o custo; negativo quando ocorrer aumento do custo energético, sem que isso resulte em proteção, ou ainda comportar-se de forma neutra (BOSTOCK, 2005).

Um modelo para demonstrar esse balanço energético na planta foi proposto por Gayler et al. (2004), onde assimilados são disponibilizados através da fotossíntese, e utilizados para o crescimento produzindo biomassa estrutural. Parte dos assimilados é carregada para gerar defesas constitutivas e o excedente é conduzido para tecidos de reserva. Quando a planta necessitar, estes fotoassimilados são carregados para a defesa induzível e se a disponibilidade dos mesmos for baixa, pode ocorrer o fornecimento por parte das reservas, e estes voltam a ser disponíveis. O processo de respiração é o único a causar perda de biomassa. Porém, quando o produto de interesse envolve os tecidos de reserva da planta, a inversão ou mesmo o fato da planta priorizar outros processos e não conduzir os assimilados disponíveis para a reserva há o que chamamos de custo adaptativo, com conseqüente redução na produtividade (Figura 2).

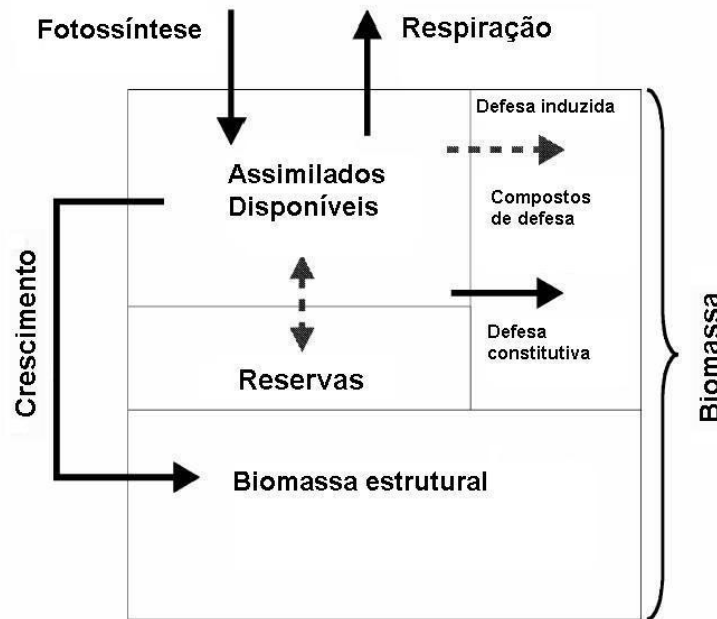


Figura 2 - Modelo para o balanço energético entre crescimento e defesas proposto por Gayler et al. (2004)

Além do custo energético envolvido com a expressão de genes, existe o custo metabólico, que é explicado pela repressão de alguns genes, os quais possuem participação no crescimento ou no metabolismo primário das plantas. Esta repressão pode ocorrer para balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro do sistema planta, como efeito compensatório (SOMSSICH; HAHLBROCK, 1998), dando menor importância à uma atividade que no momento se tornou secundária, aproveitando os recursos celulares disponíveis, incluindo substrato e energia (LOGEMANN et al., 1995).

Weidhase e colaboradores (1987) observaram que quando folhas destacadas de cevada eram tratadas com JA ou MeJa, ocorria um decréscimo no nível de clorofila e na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), indicando aceleração da senescência. Porém, também observaram o aparecimento de pelo menos três novas classes de proteínas que poderiam estar relacionadas a defesa celular.

Reinbothe; Reinbothe e Parthier (1993), estudando padrões de proteínas em folhas de cevada induzidas com MeJa, observaram a formação de proteínas, as quais

denominaram de proteínas induzidas por jasmonato (JIPs – do inglês *Jasmonate-Induced Proteins*). Em contrapartida, o tratamento causou uma redução no nível de proteínas no plastídeo, coincidentemente com redução das pequenas e grandes subunidades da Rubisco e da clorofila.

Em função de alterações na clorofila e/ou Rubisco espera-se uma redução na taxa fotossintética. Baldwin e Callahan (1993), embora não tenham avaliado a concentração de clorofila ou Rubisco, observaram uma redução da taxa fotossintética correlacionada inversamente com o aumento da concentração do alcalóide nicotina em *Nicotiana sylvestris*, induzida por ferimento. O contrário também tem sido observado, pois Khodary (2004), induzindo plantas de milho com AS (100 mM), observou aumento da atividade da Rubisco e da atividade fotossintética, bem como aumento no conteúdo das clorofilas *a* e *b* e carotenóides.

Outros eventos metabólicos relacionados ao ciclo celular também podem ser inibidos. Logemann et al. (1995) induziram células de salsa em meio de cultura com luz UV e elicitor proveniente de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* e observaram a expressão da FAL e CHS, concomitantemente com a repressão de mRNA codificador de proteínas tipo histonas (*H2A*; *H2B*; *H3-7* e *H4-3*), importantes na divisão celular, proteína quinase (*p34<sup>cdc2</sup>*) importante na sinalização da divisão celular e uma ciclina mitótica atuante na divisão celular. Os autores também observaram o comportamento do aumento do volume de células. Coincidentemente, células eliciadas com luz ultravioleta (UV) cessaram o crescimento, inibiram a síntese de mRNA de proteínas do ciclo celular e induziram a síntese de mRNA para FAL e CHS. A partir do momento em que a UV foi retirada a síntese de mRNA para FAL e CHS foi reprimida e a síntese de mRNA das proteínas do ciclo celular foi iniciada, sendo retomado o crescimento. Já para o elicitor fúngico, as células permaneceram induzidas por mais tempo, expressando principalmente FAL, sendo que as proteínas do ciclo celular permaneceram reprimidas mais tempo e o crescimento permaneceu inibido. Neste contexto, Suzuki et al. (2006) observaram em culturas de células de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, linha XD6S), a expressão de mRNA que codifica quitinases induzidas pela presença no meio de um extrato de parede celular de *Phytophthora infestans* (PiE) ou pela presença de uma xilanase de *Trichoderma viride* (TvX). Concomitantemente, observaram redução na

expressão dos genes *Ntf3* e *Ntf6*, que codificam MAP quinases em fumo relacionadas ao ciclo celular, bem como dos genes que codificam ciclinas mitóticas (*CycA1;1*, *CycB1;3*, *CycD3;2*). Esses genes que se apresentam em níveis substanciais quando as células de fumo estão em ativo processo de proliferação, foram completamente inibidos, tendo como consequência uma significativa redução na multiplicação das células.

### 2.1.3 Autotoxidade

Embora o custo diretamente relacionado à expressão de genes possa ser considerado como o mais importante, é preciso lembrar que alguns metabólitos envolvidos na resistência podem ser tóxicos para as plantas e a expressão constitutiva dos mesmos pode impor uma significativa carga metabólica (HEIL, 2001; HEIL; BALDWIN, 2002). Na literatura, trabalhos que se ocupam em explicar este fenômeno ainda são escassos. A produção de compostos como o AS, em altas concentrações, pode ser danosa ao tecido vegetal jovem, como demonstrado por Rasmussen; Hammerschmidt e Zook (1991) que observaram uma correlação entre a alta concentração de AS em folhas de pepino em expansão e o consequente atrofiamento destas. Da mesma forma, espécies ativas de oxigênio (EAO), que participam do processo de morte celular programada (LAMB; DIXON, 1997), bem como fitoalexinas (CAVALCANTI; BRUNELI; STANGARLIN, 2005) apresentam efeito danoso ao tecido vegetal.

Baldwin e Callahan (1993) elevaram o nível de nicotina fornecido exogenamente nos tecido foliares de *Nicotiana sylvestris* e *Nicotiana glauca*, que naturalmente produzem este alcalóide como defesa induzível e *Datura stramonium* e tomate, que não produzem nicotina. Os autores observaram que o alto teor do alcalóide reduzia a capacidade fotossintética de todas as plantas, embora apenas *N. sylvestris* e *N. glauca* tivessem a biomassa reduzida, não sendo atribuído apenas a redução da capacidade fotossintética, mas também a possível alteração no balanço hormonal nas plantas.

### 2.1.4 Custo Ecológico

O custo ecológico ou custo indireto da resistência requer interações com outras espécies para ser expresso. Dentre estas interações destacam-se a deterrência de

mutualistas, como polinizadores, dispersores de sementes, predadores e parasitóides de herbívoros, fungos micorrízicos, fungos endofíticos e bactérias nodulantes; aumento do parasitismo por outros patógenos, aumento da predação por parte de outros herbívoros; redução da tolerância a inimigos ou redução da habilidade competitiva inter ou intraespecífica (STRAUSS et al., 2002).

As plantas respondem a indução de resistência por diversos mecanismos, que além dos já mencionados, podem também incluir alterações na fisiologia e morfologia radicular, alocação do carbono e exsudação radicular (BAREA et al., 2005; LYNCH, 1990; MORGAN; BENDING; WHITE, 2005). A exsudação radicular e a liteira são importantes fontes de C para a microbiota e macrobiota do solo e podem ser significativos no desempenho da microbiota decompositora (MORGAN; BENDING; WHITE, 2005; WARDLE et al., 2003; WARDLE; WALKER; BARDGETT, 2004; WARDLE et al., 2004; WARDLE; BARDGETT, 2004). Além disso, a morfologia e a exsudação radicular podem influenciar diretamente organismos simbioses, parasitas, saprófitas (facultativos) e fitopatógenos rizosféricos (BAREA et al., 2005; CARDOSO; FREITAS, 1992; LYNCH, 1990; MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; MORGAN; BENDING; WHITE, 2005; SONNEMANN; MIKA; WOLTERS, 2005; WHIPPS, 2001).

A literatura mostra resultados conflitantes do impacto da resistência induzida em patógenos radiculares, e que de acordo com Sonnemann; Finkhaeuser e Wolters (2002) podem ser atribuídos ao *status* nutricional da planta hospedeira, tipo de indutor de resistência utilizado, a espécie vegetal e finalmente ao patógeno envolvido. Uma das possíveis explicações para a elevada variabilidade da efetividade da resistência induzida é que a mesma está sujeita a modulação por fatores ambientais, como o estresse hídrico ou nutricional (LYON; NEWTON, 1997; BOSTOCK et al., 2001). Além disso, alguns autores consideram que o uso da resistência induzida poderia interferir na composição, funcionamento e desempenho da comunidade do solo (HEIL, 1999; HEIL et al., 2000; HEIL, 2001; HEIL; BOSTOCK, 2002; SONNEMANN; FINKHAEUSER; WOLTERS, 2002; SONNEMANN; MIKA; WOLTERS, 2005). Parece que estes efeitos negativos poderiam ter relação com a natureza inespecífica da indução de resistência (HEIL, 1999).

#### **2.1.4.1 Efeito sobre insetos polinizadores**

Strauss et al. (1999) relataram efeitos negativos da indução de resistência na taxa de frequência de insetos polinizadores. Além disso, a resistência induzida em plantas pode elevar a concentração de compostos secundários nos frutos, tecidos florais ou néctar (néctar tóxico), tornando-as menos atrativas para insetos polinizadores (ADLER, 2000a). Para Adler (2000a,b) existe uma possibilidade relativa que a toxidez do néctar esteja relacionada com a presença de altas concentrações de compostos secundários de defesa em verticilos florais. Neste caso, é provável que seja uma consequência da ação defensiva da planta, em resposta ao ataque de herbívoros em outras partes da planta. Entretanto, há casos em que a toxidez do néctar não está relacionada com a resposta defensiva da planta contra a ação de herbívoros. Prys-Jones e Willmer (1992) relataram que a toxidez do néctar de *Lathraea clandestina* é devida à presença de amônia, produzida a partir da degradação de aminoácidos. Essa toxidez pode aumentar como consequência do pleiotrofismo resultante da ação defensiva da planta contra herbívoros e persistir devido a especialização por parte dos polinizadores ou outros aspectos benéficos à planta (ADLER, 2000a,b).

Para Agrawal; Gorski e Tallamy (1999), a resposta da planta à indução de resistência pode aumentar a sua suscetibilidade para herbívoros ocasionais, seja pela alteração na atração de herbívoros específicos ou devido a alterações nas respostas relacionadas as vias de sinalização para certos tipos de herbívoros considerados pragas. Ainda de acordo com estes autores, cucurbitáceas produzem cucurbitacinas, que podem torná-las resistentes a uma gama de artrópodes herbívoros, mas torná-las também suscetíveis a besouros que usam a cucurbitacina como estímulo atrativo para a alimentação.

#### **2.1.4.2 Efeito sobre as simbioses micorrízicas e rizóbio-leguminosa**

Estudos têm demonstrado que os organismos simbióticos mutualistas (não patogênicos) e não mutualistas (patogênicos) ao longo de sua co-evolução com as plantas hospedeiras, foram adaptando-se ao sistema defensivo natural das mesmas (CIPOLLINI; PURRINGTON; BERGELSON, 2003; HEIL, 1999; HEIL et al., 2000; HEIL, 2001; WOLFE; HUSBAND; KLIRONOMOS, 2005). Entretanto, pouco se sabe acerca do

impacto da indução da resistência no mutualismo entre plantas e microrganismos (HEIL, 2000; HEIL, 2001). De acordo com alguns autores na maioria das interações simbióticas parasíticas ou mutualísticas, a planta hospedeira ativa seu sistema defensivo induzível em resposta a presença do invasor (CORDIER et al., 1998; DUMAS-GAUDOT et al., 1996; PIETERSE; VAN LONN, 1999; RUIZ-LOZANO et al., 1999; VAN WESS et al., 1997; VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998).

Comparados com fungos fitopatogênicos, e à semelhança com a simbiose *Rhizobium*-leguminosas, os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) induzem respostas de defesa vegetal atenuadas (KAPULNIK et al., 1996; LAMBAIS; MEHDY, 1998), onde a planta hospedeira expressa constitutivamente algumas proteínas-RP (VIERHEILG et al., 1995). Pozo; Van Loon e Pieterse (2004) constataram que as células que contêm os arbúsculos em plantas com raízes micorrizadas são imunes ao ataque de fitopatógenos e exibem resistência localizada, como a formação de calose adjacente às hifas intracelulares. Estes dados também foram similares aos obtidos por Lambais e Medhy (1998).

A aplicação de AS na planta pode inibir a atividade da catalase e induzir o acúmulo de EAO e ativar diversos genes ligados ao sistema de defesa bioquímico da planta, incluindo quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (DANN et al., 1996; LEITE et al., 1997; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998). Dessa forma, atividades mais elevadas de catalases em raízes inoculadas com fungos micorrízicos mais infectivos para a planta hospedeira, podem levar à atenuação das defesas da mesma, facilitando o crescimento intrarradicular (COSTA; RIOS-RUIZ; LAMBAIS, 2000). Costa; Rios-Ruiz e Lambais (2000) observaram que a aplicação de ácido salicílico em raízes de feijoeiro, em solo com baixo nível de fósforo, resultou na redução da colonização intrarradicular, corroborando com a hipótese de que  $H_2O_2$  pode ser um mensageiro secundário importante no controle do desenvolvimento de simbiose micorrízica (LAMBAIS; MEHDY, 1993; 1995). O efeito negativo do AS na colonização das raízes de feijão ocorre, provavelmente, devido à inibição do crescimento fúngico intrarradicular, e não devido ao efeito inibitório nas fases de pré-infecção (germinação dos esporos, crescimento de tubos germinativos e diferenciação de apressórios), já que os níveis iniciais de colonização, em todas as situações, foram similares nos trabalhos de Lambais e Mehdy



(1993; 1995), e, aparentemente, a elevada atividade de quitinases nas raízes que receberam o AS, é fator determinante dos baixos níveis de colonização micorrízica (LAMBAIS; MEHDY, 1993; 1995). Muito embora o papel das quitinases no controle do estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular seja ainda desconhecido, é provável que a indução localizada de isoformas específicas desta enzima possam inibir o crescimento fúngico intrarradicular (LAMBAIS; MEDHY, 1995; 1998).

Aparentemente, a capacidade de FMAs em colonizar o tecido cortical da planta hospedeira está relacionada à sua capacidade em suprimir as atividades de quitinases (LAMBAIS; MEDHY, 1996). Já existe comprovação experimental de que o AS acumula em raízes micorrizadas durante a fase inicial do estabelecimento da simbiose (BLILOU; OCAMPO; GARCIA-GARRIDO, 1999). Sob este aspecto, a literatura comprova que as modificações citológicas que ocorrem em raízes micorrizadas são similares às descritas em raízes de plantas colonizadas por rizobactérias que induzem resistência sistêmica (CORDIER et al., 1998).

O uso do ASM simula o efeito do AS na planta, e aparentemente com o mesmo modo de ação ao nível celular (GORLACH et al., 1996; LAWTON et al., 1996) e não resulta em acúmulo local de AS endógeno (MARTÍNEZ-ABARCA et al., 1998). Deste modo, todas as respostas bioquímicas defensivas induzidas pelo AS, também podem ser induzidas pela ação do ASM (FRIEDRICH et al., 1996). Hoffman e Cardoso (2001) também relataram que a aplicação de ASM nas raízes de soja ocasionou efeitos negativos na intensidade de colonização por *Bradyrhizobium elkanii*, restringindo a viabilidade da aplicação do produto na cultura. Deste modo, segundo os autores, a aplicação radicular do ASM deve ser evitada na cultura da soja, não havendo restrições do produto para aplicação foliar. Ainda de acordo com estes autores, a interação simbiótica poderia ter a capacidade de inibir a reação de defesa da planta. Por outro lado, os autores não observaram nenhum efeito da ação do ASM, em qualquer modo de aplicação, na colonização micorrízica de *Glomus intrarradices*. Tosi e Zazzerini (2000) constataram que o ASM inibiu *in vitro* a germinação de esporocarpos de *Glomus mosseae*, ao passo que a aplicação de BABA estimulou a germinação de *G. mosseae*. Também foi observado que a aplicação foliar do BABA e ASM (4000 e 200µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) não acarretou nenhum efeito na taxa de colonização do fungo.

Efeitos negativos da aplicação exógena de AS no tamanho e número de nódulos na simbiose entre alfafa (*Medicago sativa*) e *Rhizobium meliloti* foram observados por Martinez-Abarca et al. (1998). Segundos estes autores, o AS poderia estar interferindo no processo de organogênese nodular.

### **2.1.5 Crescimento e produtividade de plantas induzidas**

Como uma diversidade de situações pode acontecer enquanto ocorre o desenvolvimento de uma planta e a indução de resistência concomitantemente, principalmente em função da variação nas condições de crescimento, a seguir serão analisados alguns trabalhos, onde parâmetros de produtividade e de produção foram avaliados em experimentos com plantas induzidas e que mostram dependência em função da dose do indutor, da condição nutricional e da interação biológica a que estão sujeitas.

#### **2.1.5.1 Dependência da dose do indutor**

Godard et al. (1999) conduziram experimento com couve-flor induzindo resistência contra o míldio (*Peronospora* sp.) com o uso de ASM, em diferentes concentrações. De 1 a 30 dias as plântulas foram pulverizadas com suspensões de conídios e sete dias após cada inoculação, as plantas foram avaliadas usando-se escala de notas. Os autores observaram que a doença podia ser controlada em diferentes níveis, dependendo da concentração, porém ocorria uma redução na altura das plantas que variou em torno de 6 a 25%.

Em campos cultivados com tomate, foram conduzidos 15 experimentos em cinco localidades (Flórida, Alabama, Carolina do Norte, Ohio e Ontário), representando uma grande diversidade nos sistemas de produção de tomate na parte leste dos EUA e Canadá. Na maioria dos experimentos, o ASM foi aplicado semanalmente, em uma dose de 35 g ha<sup>-1</sup>, e reduziu a severidade da mancha bacteriana provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, em níveis superiores a 50%. Esse nível de controle foi semelhante e, em alguns casos, superior ao do tratamento-padrão, representado por pulverizações semanais com a mistura hidróxido de cobre e fungicida protetor. A produção total não foi significativamente afetada pelo tratamento com ASM ou pelo tratamento-padrão em 13 dos 15 experimentos realizados (LOUWS et al., 2001).

Redman; Cipollini Junior e Schultz (2001) conduziram experimentos com tomate cultivado em casa de vegetação, em condição livre de insetos. As plantas foram tratadas com 1 ou 10 mM de ácido jasmônico (AJ) dissolvido em álcool e diluído em água, sendo pulverizado uniformemente até o escorrimento. As plantas controle foram pulverizadas com o solvente. Os autores observaram diminuição do número de frutos em resposta a aplicação de 10 mM de AJ em relação ao controle, porém os frutos eram maiores. Outro fator importante foi o tempo para o início da maturação, o qual atrasou em 20 dias para a concentração de 10 mM e 10 dias para 1 mM em relação ao controle. Outro aspecto foi a redução do número de sementes nos frutos das plantas que receberam 10 mM. O crescimento das plantas e a germinação das sementes não foram afetados pelos tratamentos com AJ. Os autores consideram que defesas induzidas por AJ podem ter efeito na adaptabilidade reprodutiva de plantas de tomate, que embora produzindo frutos maiores, a quantidade dos mesmos e de sementes é menor, além do atraso na maturação.

Iriti e Faoro (2003b) conduziram experimentos com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* cv. – BLF), cultivado em condições de casa de vegetação e telado no campo, induzido com ASM ( $140 \text{ mg L}^{-1}$ ) em uma única aplicação quando a primeira folha estava completamente expandida. Os autores não detectaram diferenças na taxa de crescimento, comprimento de entrenós e expansão foliar medidos aos 15, 30, 45 e 60 dias após a aplicação do indutor em casa de vegetação. Porém, no campo, em dois anos de cultivo, houve sensível diferença na produção devido ao menor número de vagens e menor peso seco das sementes. Visto que a análise de variância não mostrou significância, os autores consideraram que nas condições estudadas não havia evidências de custos associados ao tratamento com o indutor ASM.

Estes experimentos demonstram claramente a penalidade sobre o desenvolvimento das plantas e/ou produtividade em função da dose utilizada e da quantidade de aplicações dos elicitores, ainda que, no caso do trabalho de Louws et al. (2001) onde não há redução da produtividade, porém, se há redução da doença em nível superior a 50%, esperava-se que houvesse aumento na produtividade, pelo menos para compensar a aplicação do indutor. Di Piero; Kuhn e Pascholati (2005) já

chamaram a atenção para esses fatos, sugerindo que o número de aplicações e as dosagens precisam ser otimizados.

### **2.1.5.2 Dependência da condição nutricional**

Heil et al. (2000) conduziram três experimentos com trigo, dos quais o primeiro foi em solução nutritiva onde as plantas receberam 0,05 e 1 mM de N e aplicação de 150 mg L<sup>-1</sup> de ASM 4 semanas após a semeadura e água como controle. O segundo experimento foi conduzido em vasos, onde as plantas receberam duas vezes por semana 0, 50 e 200 mL de solução nutritiva contendo 1 mM de N, além de macro e micro nutrientes e a aplicação de 150 mg L<sup>-1</sup> de ASM ou água, quando as plantas atingiram o estágio de dois nós. Em um terceiro experimento, as plantas receberam diferentes soluções contendo 0, 5 e 10 mM de N, neste caso variando apenas a quantidade de N, distribuindo-se 100 mL por vaso duas vezes por semana. Quando as plantas atingiram o estágio de dois nós, foram distribuídas ao acaso e separadas em quatro grupos sendo um imediatamente tratado com 150 mg L<sup>-1</sup> de ASM, outro três semanas após, outro após o término do perfilhamento e um sem tratamento.

No primeiro experimento, os autores observaram uma redução no peso seco das plantas de três a quatro semanas após o tratamento para ambas as condições nutricionais, porém sempre uma maior diferença na menor dosagem de N. No segundo experimento, as plantas controle cresceram mais, o que era visível na sexta semana após o tratamento. Em relação à aplicação de nutrientes, a biomassa só diferiu nos tratamentos representados pela média e alta fertilização, não diferindo no tratamento sem nutriente, visto que o estresse nutricional era bastante intenso e o crescimento muito reduzido. O número de espigas por vaso também diferiu somente nas condições com médio e alto teor de nutrientes, onde se observou a redução do número de espigas e de sementes pela aplicação de ASM. Já no terceiro experimento, onde se variou apenas a dosagem de N e não nos micro e macro nutrientes, observou-se uma nítida dependência do N para que não ocorressem penalidades no acúmulo de biomassa. Neste experimento, com zero de N, todos os parâmetros avaliados diferiram entre plantas induzidas ou não, sendo eles: número de perfilhos, biomassa de perfilhos, espigas por vaso, sementes por espiga e sementes por vaso. Já com 5 mM de N,

apenas o número de espigas por vaso e sementes por vaso diferiram, e com 10 mM de N não houve diferença. Com relação a época de aplicação, quando esta foi efetuada após o perfilhamento, não houve alterações na biomassa e/ou produtividade em nenhuma das condições nutricionais.

Dietrich; Ploss e Heil (2005) investigaram o custo adaptativo de *Arabidopsis* em diferentes condições de fornecimento de N. Para tanto, os autores conduziram experimentos que visavam avaliar a resposta de crescimento de plantas tratadas com ASM. As plantas foram cultivadas em vasos com solo comercial, sem nitrogênio, em condições de câmara de crescimento, sendo irrigadas três vezes por semana. Uma vez por semana, os vasos recebiam 10 mL de solução contendo 1 (N1), 3(N3), 10(N10) e 30(N30) g L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio. Após 25 dias, as plantas foram submetidas duas vezes ao tratamento indutor (150 mg L<sup>-1</sup> de ASM). Foram avaliados semanalmente, o diâmetro da roseta e o peso das sementes. Os autores observaram que na primeira semana após a aplicação do indutor houve uma redução no diâmetro da roseta para todos os regimes de N. Na condição altamente limitante (N1) esta diferença tornou-se menor com o crescimento, porém, as plantas induzidas permaneceram sempre menores do que as plantas controle. Plantas induzidas, cultivadas com alta concentração de N (N30), após a segunda semana compensaram a redução no crescimento e tornaram-se maiores do que as plantas controle. No mesmo experimento, somente com N3 e N10 as plantas induzidas produziram menos sementes do que o controle, considerando que a produção de sementes na condição altamente limitante foi muito baixa, tanto para induzidas como para não induzidas, que não foi possível diferenciar os tratamentos. Quando o experimento foi repetido, novamente houve redução no crescimento das plantas tratadas com ASM na primeira semana e uma compensação na segunda semana, porém, não se observou um crescimento maior do que o controle na terceira semana com N30. Dessa forma, os autores concluíram que plantas crescendo sob condições limitantes de N somente compensam parcialmente o crescimento, permanecendo continuamente menores do que o controle. Entretanto, as plantas que receberam altas doses de N (N30) tiveram um crescimento compensatório maior, tornando-se significativamente maior do que o controle. Portanto,

a capacidade de compensação depende das condições de crescimento e de fornecimento de nitrogênio.

Como pode ser observado nos trabalhos acima, o menor custo da indução de resistência está principalmente relacionado ao fornecimento de nitrogênio. Uma possível explicação pode ser devido ao fato dos mecanismos de resistência serem baseados na síntese de proteínas e de enzimas envolvidas em diferentes caminhos metabólicos, o que requer uma maior demanda por nitrogênio, o qual é suprido por fontes exógenas.

Na natureza, o nitrogênio é abundante, compreendendo 78% da atmosfera terrestre. De acordo com Coley; Bryant e Chapin (1985), no contexto evolutivo, seria vantajoso basear todo um sistema de defesa em elemento químico que é abundante, visto que não haveria falta do mesmo. Por outro lado, um sistema de defesa baseado na disponibilidade de carbono poderia funcionar em plantas de deserto, onde o mesmo é abundante. Porém, em uma floresta densa talvez não seja a melhor alternativa, uma vez que há grande competição por esse elemento.

No contexto agrícola moderno, onde a maioria dos solos estão degradados e a concentração de nitrogênio bastante baixa, os reflexos na produtividade em função da expressão dos mecanismos de defesa podem ser sentidos com maior facilidade.

### **2.1.5.3 Dependência da interação biológica**

Ongena et al. (1999) induziram plantas de pepino, cultivadas em casa de vegetação, inoculando agentes bióticos como *Pseudomonas putida* (BTP1) e seu transformante sideróforo negativo (M3), mergulhando-se as raízes em suspensão bacteriana durante o transplante, com o intuito de controlar a doença causada por *Pythium aphanidermatum*. Os autores observaram acentuada redução da severidade da doença em função da indução da síntese de compostos fenólicos por parte da planta, impedindo o desenvolvimento do patógeno. No entanto, não ocorreu redução no acúmulo de massa fresca da planta e houve aumento da massa seca de raízes para as plantas que receberam o isolado BTP1.

Nandakumar et al. (2001), trabalhando com arroz cultivado em condições de campo, induzido com dois isolados de *Pseudomonas fluorescens* (PF1 e FP7) contra

*Rhizoctonia solani*, aplicados via tratamento de sementes, solo, mergulho de raízes em suspensão ou aplicação foliar, observaram aumentos na expressão de enzimas, como quitinase e peroxidase associados à redução da severidade da doença, bem como aumentos na produção de grãos em níveis superiores ao tratamento com fungicida. Vidhyasekaram et al. (2001), também trabalhando com arroz cultivado em casa de vegetação induzido com *P. fluorescens*, por tratamento de sementes, para o controle de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, observaram redução da intensidade da doença superior ao tratamento com antibiótico (estreptociclina) e conseqüente aumento na produtividade.

Por sua vez, Kehlenbeck e Schönbeck (1995) induziram resistência em cevada, em condições de campo com o filtrado de cultura de *Bacillus subtilis* (B50) contra *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* inoculado naturalmente. Os autores observaram uma redução de 40% na área foliar infectada nas plantas induzidas, enquanto que para o tratamento com fungicida (propiconazole) a redução foi de 93%. Com o uso do indutor foi obtida a maior produtividade, e a qualidade dos grãos foi melhorada em termos de teor de amido.

Finalmente, com base nos últimos quatro trabalhos acima comentados, toda vez que a resistência é induzida por rizobactérias, fica evidente que, além da redução da doença existe um ganho na produtividade e/ou qualidade. Até o momento, não encontramos na literatura trabalhos em que um indutor biótico tenha causado efeitos negativos na produtividade. Provavelmente isso se deve ao fato da resistência proporcionada por rizobactérias estar mais relacionada ao pré-condicionamento. Verhagen et al. (2004) avaliaram 8.000 genes de *Arabidopsis* em resposta ao tratamento com rizobactéria, sendo que, desses genes, apenas 97 mostraram alterações nas raízes, sendo que nenhum mostrou alteração na parte aérea, embora as plantas estivessem protegidas contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* e *Peronospora parasítica*. Estes autores observaram que entre os genes expressos diferencialmente nessas plantas pré-condicionadas pelo tratamento com rizobactérias (ISR) e desafiadas com *P. syringae* pv. *tomato*, 35% eram induzidos via AJ/ET, 17% pelo sinergismo das vias do AJ/ET + AS e apenas 3% pela via do AS, além de 45%

serem induzidos por outras vias de sinalização. Quando a planta era induzida por tratamento com patógeno (SAR), apenas 30% dos genes eram induzidos via AJ/ET, 22% pelo sinergismo de AJ/ET + AS e 12% pela via do AS, enquanto que 36% eram induzidos por outras vias. Esses resultados podem indicar que a via do AJ/ET apresenta custo inferior em relação a via do AS, além do que, o pré-condicionamento por rizobactérias praticamente não gera custos.

## **2.1.6 Enzimas envolvidas na indução de resistência**

### **2.1.6.1 Peroxidases**

O termo “peroxidase” tem por significado identificar a enzima que catalisa a oxiredução entre peróxido de hidrogênio e vários redutores. São enzimas presentes em tecidos de animais, plantas e em microrganismos (HIRAGA et al., 2001), sendo divididas em três superfamílias, denominadas Peroxidase animal, Catalase e Peroxidase de plantas, sendo esta última dividida em três classes, onde a Classe I apresenta a citocromo *c* peroxidase, presente em leveduras e bactérias, a catalase peroxidase, presente em bactérias e fungos e a ascorbato peroxidase presente em plantas. A Classe II apresenta as peroxidases dependentes de manganês e ligninases, ambas presentes em fluídos extracelulares de fungos. Na Classe III são classificadas as peroxidases de plantas, responsáveis pela maioria das reações de oxiredução estimuladas pelas variações ambientais, injúrias e reações infecciosas. A grande maioria das publicações apresentam a sigla POX para este tipo de peroxidase. A atividade da POX foi descrita em 1855 por Schönbein e recebeu o nome “peroxidase” em 1898 por Linossier e isolada e caracterizada em 1923 por Willstätter e colaboradores (THEOREL, 1951).

As peroxidases apresentam um grande número de isoformas, sendo, por exemplo, em *Arabidopsis* codificadas por mais de 100 ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*)(DAYAN et al., 1999) e em arroz 42 ESTs foram identificadas codificando independentes POX (YAMAMOTO; SASAKI, 1997). Em arroz foram identificadas 25 isoenzimas e 12 em fumo, separadas por eletroforese em gel, com base no ponto isoelétrico (ITO et al., 1991; LAGRIMINI; ROTHSTEIN, 1987). Essa diversidade de isoformas de POX impedem estudos mais detalhados de uma



determinada isoforma, visto que, além de um grande número de isoformas, uma isoforma isolada, atua sobre vários substratos *in vitro* (BERNARDS et al., 1999; DE MARCO; GUZZARDI; JAMET, 1999; KVARATSKHELIA; WINKEL; THORNELEY, 1997; QUIROGA et al., 2000), O contrário também pode ocorrer, onde mais de uma isoforma pode atuar sobre o mesmo substrato, e, portanto, não seria adequado considerar o funcionamento individual de POXs baseado apenas em estudos *in vitro* (HIRAGA et al., 2001).

As POXs apresentam várias funções na defesa celular, pela sua participação na lignificação, suberização e metabolismo de parede celular, sendo classificadas por Van Loon e Van Strien (1999) como proteínas relacionadas a patogênese (proteínas - PR) pertencentes a família PR-9. O funcionamento básico das POXs consiste em reagir com compostos contendo grupos hidroxila anexado a um anel aromático (HIRAGA et al., 2001). A reação clássica destas enzimas é a oxidação desidrogenativa do guaiacol (*o*-metoxi-fenol) que resulta na formação de radicais fenoxi, sendo que a subsequente ligação de radicais instáveis leva a polimerização não enzimática de monômeros e de maneira similar, hidroxicinamil álcool e seus derivados são convertidos em radicais fenoxi formando lignina, bem como o ácido hidroxicinâmico, contendo grupos funcionais alifáticos, é convertido em suberina (HIRAGA et al., 2001).

POXs também oxidam domínios fenólicos de polissacarídeos ferulicolados (polisacarídeo ligado a ácido ferúlico) (FRY, 1986; VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980;) e resíduos de tirosina de proteínas estruturais da parede celular, como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (EVERDEEN et al., 1988; BROWNLEADER et al., 1995), formando moléculas maiores e mais complexas, a partir da ligação cruzada dos radicais (HIRAGA et al., 2001). As macromoléculas polimerizadas pelas POXs também são depositadas na superfície extracelular, fortalecendo a parede celular, restringindo a invasão por patógenos, e a expansão celular (HIRAGA et al., 2001).

Devido a descarboxilação oxidativa proporcionada pela POX, acredita-se que a mesma pode participar do processo de inativação do ácido indol acético (AIA), via conversão para ácido oxindol-3-acético pela oxidação. Neste contexto, Lagrimini et al. (1997) observaram em fumo transgênico, expressando intensamente uma peroxidase, a supressão da formação de raízes laterais, provavelmente por causa do aumento da

degradação do AIA. Gazaryam e Lagrimini (1996) já haviam observado anteriormente a degradação do AIA *in vitro* por esta mesma peroxidase isolada. Entretanto, o significado fisiológico da degradação via peroxidase é duvidoso, visto que, não foram observadas alterações nos níveis de AIA em plantas transgênicas com a expressão de peroxidases aumentada em 10 vezes ou com essa atividade reduzida em 10 vezes (NORMANLY; SLOVIN; COHEN, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004)

Durante seu desenvolvimento, as plantas passam por diversos estresses como ferimentos causados por vários fatores bióticos ou abióticos que levam a planta a perder órgãos essenciais ou estar sujeita a fácil penetração por patógenos (HIRAGA et al., 2001). Por isso, a planta ativa sistemas de auto defesa em resposta a ferimentos para restaurar tecidos danificados ou para se defender de patógenos e insetos. Entre o grande número de proteínas induzidas por ferimentos estão as POXs (HIRAGA et al., 2001), cuja expressão está espacial e temporalmente correlacionada com a deposição de suberina nos tecidos danificados (BERNARDS et al., 1999; ESPELIE; KOLATTUKUDY, 1985; ESPELIE; FRANCESCHI; KOLATTUKUDY, 1986).

A expressão das POXs também está correlacionada com a ocorrência de infecção por patógenos. O papel destas no processo de defesa é reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos ferulicolados e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (BOWLES, 1990; FRY, 1986; VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980), aumento na produção de EAO que apresentam ação antimicrobiana, bem como atuam na sinalização (BOLWELL et al., 1995; KAWANO; MUTO, 2000; WOJTASZEK, 1997), induzindo a formação de fitoalexina (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999), participam também na peroxidação de lipídios que apresentam papel na sinalização, induzindo o acúmulo de AS (LÉON; LAWTON; RASKIN, 1995).

Na indução de resistência as peroxidases são bastante estudadas devido a sua importância nos processos de defesa, e na maioria dos casos o aumento na atividade está diretamente relacionado a redução da severidade da doença. Madi e Katan (1998) observaram o aumento de forma sistêmica da peroxidase em melão e em algodão em função do tratamento, por infiltração, de filtrado de cultura ou suspensão de esporos de *Penicillium janczewskii*, um fungo promotor de crescimento, que claramente reduziu a

incidência de tombamento, causada por *Rhizoctonia solani* em melão, em 85% para ambos tratamentos, e, o mesmo acontecendo em algodão. Cachinero et al. (2002) induziram resistência contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, causador de murcha em grão-de-bico utilizando-se de raça avirulenta desse patógeno, bem como, de dois isolados de *F. oxysporum* não patógenos desta cultura, sendo que a pré-inoculação desses indutores promoveu o atraso de 3 a 7 dias o desenvolvimento da doença, atingindo no final uma redução de 24 a 40% no índice de intensidade da doença, e, em contrapartida, a atividade de peroxidase sempre foi significativamente maior para os três indutores. Vidhyasekaram et al. (2001) induziram arroz com *Pseudomonas fluorescens* (PF1), uma rizobactéria promotora de crescimento, e, observaram redução no índice de intensidade da doença de até 85%, também correlacionado com o aumento na atividade de peroxidase e no acúmulo de lignina nos tecidos. Silva et al. (2003) observou expressivo aumento na atividade de peroxidase em tomateiro induzido por *Bacillus cereus* isolado de solo rizosférico, estando sempre sua inoculação associada ao aumento da resistência do tomateiro a patógenos como *Alternaria solani* (66%), *Corynespora cassiicola* (37%), *Oidium lycopersici* (66%), *Stemphium solani* (56%) e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (35%). Com indutores abióticos, Buzi et al. (2004) também associaram o aumento da resistência em melão, mediada por ASM e MeJa a partir do tratamento de sementes, contra *Didymela bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e, observaram o aumento na atividade de peroxidase, além do que, no mesmo trabalho o tratamento de sementes com AS não protegeu as plantas contra estes patógenos, bem como, não houve aumento na atividade de peroxidase. Iriti e Faoro (2003b) também destacam o aumento na atividade da peroxidase no processo de defesa do feijoeiro induzido por ASM contra *Uromyces appendiculatus*.

#### **2.1.6.2 Polifenoloxidasas**

Polifenoloxidasas (PFO) agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis (*o*-difenois) transformando-os em quinonas (*o*-diquinonas) constituindo uma atividade de difenolase. Porém, em algumas plantas essas enzimas podem também catalisar a *o*-hidroxilação de monofenóis, constituindo atividade de monofenolase (MAYER; HAREL, 1979; VAUGHN; DUKE, 1984). São

também referidas na literatura como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinase (OKOT-KOTBER et al., 2002). As PFO foram descobertas e nomeadas por Bertrand e Bourquelot em 1895 como tirosinase, porém, em 1938 Keili e Mann preferiram chamá-las de polifenol oxidases (DAWSON; TARPLEY, 1951). Estas enzimas estão amplamente distribuídas entre as espécies de plantas, sendo encontradas também em várias espécies de bactérias, numerosos fungos e algas, porém, não em algas unicelulares (FLURKEY, 1989; MAYER; HAREL, 1979). Nas plantas, estão geralmente distribuídas em toda sua estrutura, podendo alguns órgãos/tecidos terem maiores concentrações, bem como, o nível pode variar em função da espécie ou cultivar (MAYER; HAREL, 1979), e do ambiente, podendo sua expressão ser induzida por ferimentos ou por fornecimento exógeno de MeJa (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995). A expressão de genes que codificam PFO é altamente correlacionadas com a ativação da via sinalizadora dos octadecanóides, indicando que esta rota regula a expressão destas enzimas (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995).

As PFO permanecem intracelularmente, em sua grande maioria em estado inativado, compartimentalizadas dentro dos tilacóides nos cloroplastos, separadas dos compostos fenólicos, que também estão compartimentalizados nos vacúolos, no entanto, pequena parte pode estar extracelularmente na parede celular (MAYER; HAREL, 1979; VAUGHN; LAX; DUKE, 1988). Na medida em que ocorre a ruptura da célula, ocasionada por ferimento, ação de insetos ou patógenos, ou ainda senescência, as PFO são liberadas e iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

A massa molecular das enzimas é bastante variável e como as peroxidases, é grande o número de isoformas, o que pode significar uma maior importância biológica (MAYER; HAREL, 1979). Essa importância pode ser notada, por exemplo, em tomateiros, onde os genes são altamente conservados e diferencialmente expressos, exibindo ampla variação temporal e espacial na expressão, e, ocorrendo em resposta a vários agentes indutores, (THIPYAPONG; STEFFENS, 1997; THIPYAPONG; JOEL; STEFFENS, 1997; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004). As PFO usam o cobre como grupo prostético, o qual participa em várias reações redox (OKOT-KOTBER et al.,

2002), utilizando o O<sub>2</sub> como acceptor de elétrons para estas reações (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

As PFO tem sido bastante estudadas na área de ciência dos alimentos, devido as características negativas causada pela enzima, como a síntese de quinonas, que causam o escurecimento de frutos e vegetais (AYDIN; KADIOGLU, 2001; VAMOS-VIGYAZO, 1981). Outro aspecto, no entanto, positivo das PFO é sua participação na fotossíntese, visto que duas quinonas (Plastoquinonas A e B) participam no processo de transporte de elétrons no fotossistema II e outra, uma filoquinona altamente reativa no fotossistema I (TAIZ; ZEIGER, 2004).

No processo de defesa celular, a principal ação das quinonas é como fator antinutritivo na alimentação de insetos, onde taninos na forma fenólica são oxidados a quinonas apresentando alta reatividade com as proteínas da dieta do inseto, impedindo que este possa digerí-las, (TAIZ; ZEIGER, 2004). A ação contra fitopatógenos ocorre após a penetração, quando a enzima é liberada dos tilacóides, após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas (THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004), que apresentam ação antimicrobiana (LIU et al., 2005; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002). As a PFO também participam do processo de lignificação durante a invasão pelo patógeno (JUNG et al., 2004; MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Na indução de resistência, Chérif; Asselin e Bélanger (1994) concluíram que a conversão de fenóis a compostos tóxicos, proporcionados pela PFO, foi em grande parte responsável pelo aumento da resistência em plantas de pepino induzidas por silicatos solúveis contra *Pythium aphanidermatum*, agente causal de tombamento. Ramamoorthy; Raguchander e Samiyappan (2002) induziram resistência em tomate e pimenta, a partir do tratamento de sementes, com diversos isolados de *P. fluorescens* e observaram redução de até 50% do tombamento causado por *P. aphanidermatum*, estando esta proteção relacionada ao aumento significativo na atividade da PFO, juntamente com os efeitos também proporcionados pelo aumento da FAL e POX. Para Liu et al. (2005) a indução de resistência com ASM, também resultou em aumento na atividade de PFO em tratamento pós-colheita de frutos de pêssigo, provendo redução

da severidade de *Penicillium expansum* em 50%. Peng et al. (2004) induziram pepino com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum* contra *Cladosporium cucumerinum*, reduzindo em até 70% a severidade da doença, dependendo da dose, correlacionado com o aumento da atividade da PFO após 72 horas.

### 2.1.6.3 Fenilalanina amônia-liases

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima largamente estudada por fisiologistas por causa de sua importância chave no metabolismo secundário das plantas. Trata-se de uma enzima tetramérica composta por quatro subunidades diferentes (RITTER; SCHULZ, 2004), expressa por múltiplos genes em combinação, com possíveis modificações pós-transcricionais que levam a formação de uma gama de formas heterotetraméricas que podem diferir dependendo do estímulo em particular (DIXON; PAIVA, 1995; LIANG et al., 1989). Sua função é catalisar a eliminação não oxidativa da amônia da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico, o qual é o primeiro produto formado na rota biossintética dos fenilpropanóides em plantas superiores (JONES, 1984; RITTER; SCHULZ, 2004). A FAL tem sido encontrada principalmente em plantas superiores, mas também está presente em fungos (RÖSLER et al., 1997) e bactérias (XIANG; MOORE, 2005), mas não em animais (RÖSLER et al., 1997). Na planta, é localizada principalmente dispersa no citoplasma das células em geral, embora pode estar associada a organelas membranosas (DIXON; PAIVA, 1995; JONES, 1984). A FAL difere das POX e PFO visto atuar sobre um substrato específico, a fenilalanina. Desse modo, aparentemente, não haveria a necessidade de isoformas para atuar em substratos variáveis. No entanto, a FAL é codificada por múltiplos genes, evidenciando o grau de importância para a planta, podendo ter múltiplas combinações entre os monômeros da enzima, cuja combinação estaria em função do estímulo indutor e que direcionaria para a produção de um produto final específico (DIXON; PAIVA, 1995).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de numerosos compostos fenilpropanóides que realizam várias funções essenciais na planta (RITTER; SCHULZ, 2004). Dentre estas funções, destacam-se o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina (DIXON; PAIVA, 1995; WHETTEN; SEEDEROFF, 1995), as substâncias que atuam

como protetores contra estresses abiótico como os antioxidantes e compostos que absorvem radiação UV, ou proteção contra estresses bióticos como a ação de fitopatógenos, pela síntese de compostos como fitoanticipinas e ação de insetos mastigadores pela síntese de compostos fenólicos como fatores antinutritivos (DIXON; PAIVA, 1995). O ácido *trans*-cinâmico também é precursor de pigmentos, como antocianinas (HOLTON; CORNISH, 1995) e de moléculas sinalizadoras, como os flavonóides que são fatores de nodulação em leguminosas (WEISSHAAR; JENKINS, 1998). A FAL, além de ser importante no desenvolvimento normal da planta, mantendo de forma constitutiva estas características, é também uma enzima chave indicadora de estresses na planta (RITTER; SCHULZ, 2004). A atividade da FAL aumenta em resposta aos estresses acima mencionados, aumentando a síntese dos protetores. Pode-se ainda adicionar à lista de respostas, a síntese de fitoalexinas que só ocorre após a ocorrência do aparecimento de um patógeno, a síntese de flavonóides e isoflavonóides pela deficiência de nitrogênio, síntese de antocianinas pela deficiência de fósforo e síntese de ácidos fenólicos pela deficiência de ferro (DIXON; PAIVA, 1995).

Em meio ao fenômeno da indução de resistência, a FAL também é uma das enzimas mais estudadas. Vidhyasekaram et al. (2001), trabalhando com arroz induzido com *P. fluorescens* contra *X. oryzae* pv. *oryzae*, observaram redução na severidade da mancha bacteriana em 85% associado ao aumento na atividade da FAL. Ramamoorthy; Raguchander e Samiyappan (2002), trabalhando com tomate e pimenta com resistência induzida por *P. fluorescens*, observaram aumento na atividade da FAL somente após o desafio com *P. aphanidermatum*, no entanto, o desafio sem indução prévia não alterou a atividade desta enzima. Já Silva et al. (2003), induzindo resistência em tomateiro com *Bacillus cereus* através do tratamento de sementes, não observaram alteração na atividade da FAL, embora a atividade de peroxidase tenha sido elevada em dez vezes. Com AS, Gális et al. (2004) induziram resistência em feijoeiro e observaram redução da multiplicação do vírus do mosaico branco do trevo (WCIMV), bem como aumento na expressão da FAL. Com ASM, Liu et al. (2005) observaram aumento pouco expressivo da FAL em frutos de pêssigo, em tratamento pós-colheita, porém, a severidade de *Penicillium expansum* foi reduzida em 50%, sendo que esta redução, também estava correlacionada com aumento na atividade da PFO. Peng et al. (2004) observaram

aumento de sete vezes na atividade da FAL em pepino 48 horas após ser induzida com pectinases extraídas de *Penicillium oxalicum*.

#### **2.1.6.4 Quitinases e $\beta$ -1,3-Glucanases**

Quitinases são enzimas com atividade hidrolítica sobre a quitina, no entanto algumas quitinases podem também hidrolisar outros polímeros relacionados a parede celular, como polissacarídeos contendo ácido N-acetilmurâmico (KRAMER; MUTHUKRISHMAN, 1997).

As quitinases estão presentes em organismos que apresentam a quitina em sua estrutura, como insetos, crustáceos, leveduras e fungos, haja vista que a enzima é necessária para seu crescimento e desenvolvimento, mas também, está presente em organismos que não apresentam quitina na sua constituição, como bactérias, plantas e vertebrados (KASPRZEWSKA, 2003; KRAMER; MUTHUKRISHMAN, 1997). Em bactérias, a presença de quitinases está associada a nutrição, visto que, algumas bactérias utilizam N-acetilglucosamina como fonte de carbono, e, em plantas e vertebrados, a presença desta enzima esta quase que exclusivamente relacionada a defesa (KASPRZEWSKA, 2003). No entanto, em plantas, tem sido hipotetizado um papel no desenvolvimento de flores, senescência das folhas ou embriogênese (SCHULTZE et al., 1998), cuja participação pode estar na degradação de moléculas sinalizadoras como observado durante o processo de nodulação, onde moléculas sinalizadoras, como os lipoquitooligosacarídeos bacterianos, são degradadas por quitinases (CULLIMORE; RANJEVA; BONO, 2001; GOORMACHTIG et al., 1998).

As quitinases são classificadas em sete classes agrupadas nas famílias 18 e 19 das enzimas hidrolíticas. A família 18 inclui todas as quitinases de fungos, animais e bactérias, além de quitinases de plantas classe III e V, enquanto que a família 19 agrupa apenas quitinases de plantas das classes I, II, IV, VI e VII (KASPRZEWSKA, 2003). Além da classificação dentro das enzimas hidrolíticas, as quitinases foram também classificadas por Van Loon e Van Strien (1999) como proteínas-RP. Dentro dessa classificação, a classe PR-3 inclui as quitinases das classes I, II, IV, VI e VII, já a classe III pertence às PR-8 e a classe V às PR-11 (KASPRZEWSKA, 2003). Na célula, muitas quitinases das classes I, III e VI, com alto ponto isoelétrico (básicas), são



armazenadas nos vacúolos, enquanto que as formas ácidas das classes I, II, III, IV, e VI são secretadas para o apoplasto (ARIE et al., 2000; KASPRZEWSKA, 2003).

A atuação das quitinases está principalmente na quebra das ligações  $\beta$ -1,4 dos polímeros de N-acetilglucosamina por clivagem randômica e interna do polímero, reduzindo seu tamanho a vários fragmentos menores, tendo no final oligômeros solúveis como quitotetroses, quitotrioses e quitobioses, sendo este último em maior quantidade (KRAMER; KOGA, 1986; REYNOLDS; SAMUELS, 1996). Estes oligosacarídeos tornam-se substrato de outra enzima, a  $\beta$ -N-acetilglucosaminase, a qual quebra os oligômeros em monômeros de N-acetil-D-glucosamina (FUKAMIZO; KRAMER, 1985). Porém, algumas quitinases também hidrolisam lipoquitooligosacarídeos produzidos por bactérias fixadoras de nitrogênio, que são conhecidos como fatores NOD, atuando como sinalizadores para induzir a formação dos nódulos em leguminosas, os quais perdem a atividade após serem clivados (KASPRZEWSKA, 2002; SCHULTZE et al., 1998). Outra função está associada ao enfraquecimento da parede celular de bactérias fitopatogênicas, que embora não possuam quitina nas paredes celulares, as quitinases quebram as ligações  $\beta$ -1,4 entre N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, presentes na constituição das paredes celulares de bactérias (KASPRZEWSKA, 2002).

A presença de um patógeno induz a produção de várias quitinases de ambas as famílias, diferindo na localização, na atividade, propriedade de ligação com a quitina e mecanismo catalítico. Esta variedade de quitinases permite que a planta supra diferentes requerimentos (ISELI et al., 1996).

O tipo de quitinase produzido durante a indução de resistência está intimamente relacionado ao estímulo (indutor) ao qual a planta é submetida (KASPRZEWSKA, 2003). Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* a infecção por um microrganismo não compatível causa um aumento da expressão de mRNA de quitinases da classe IV (GERHARDT et al., 1997), porém, inoculação com patógeno compatível altera a expressão das quitinases da classe III ao redor da necrose (SAMAC; SHAH, 1991). Em feijoeiro, raízes infectadas com *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* compatível induziu o processo proteolítico de quitinases classe IV (LANGE et al., 1996), contudo, este processo não foi detectado na reação incompatível ou na interação

simbiótica (KASPRZEWSKA, 2003). Em geral, infecção por patógeno incompatível leva a uma maior e mais rápida indução sistêmica e acúmulo de quitinases, enquanto que, patógenos virulentos em geral induzem em menor grau e de maneira mais lenta (MEIER et al., 1993). Outro aspecto interessante está no fato de que AS e AJ induzem diferentes agrupamentos de proteínas-RP, e, entre elas, várias quitinases (DERCKEL et al., 1996; DING et al., 2002; THOMMA et al., 1998).

As  $\beta$ -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de  $\beta$ -1,3-glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, são os principais componentes que dão resistência a parede celular dos fungos (CORNELISSEN; MELCHERS, 1993). A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi demonstrada pela primeira vez por Kauffman et al. (1987) em proteínas-RP de fumo. A enzima está amplamente distribuída nas plantas superiores, bem como em bactérias, fungos (MARKOVICH; KONONOVA, 2003), algas e alguns invertebrados (CUTT; KLESSIG, 1992).

As  $\beta$ -1,3-glucanases de plantas tem sido classificadas em três classes estruturais que diferem na forma e seqüência em torno de 40-50%. A classe I apresenta  $\beta$ -1,3-glucanases de aproximadamente 33 kDa e são proteínas básicas localizadas nos vacúolos do mesófilo e células da epiderme (KEEFE; HINZ; MEINS JUNIOR, 1990; BULCKE et al., 1989). A classe II inclui proteínas de aproximadamente 36 kDa induzidas em folhas de fumo por TMV e duas isoformas glicosídicas de aproximadamente 41 kDa, localizadas no estilete (LOTAN; ORI; FLUHR, 1989; ORI et al., 1990). A Classe III possui um único representante que é uma PR-Q encontrada em folhas de fumo inoculadas com TMV (PAYNE et al., 1990). As isoformas das classes II e III são ácidas e localizadas extracelularmente (BEFFA; MEINS Jr., 1996). Já na classificação de Van Loon e Van Strien (1999) essas enzimas são classificadas como proteínas-RP dentro da família PR-2.

Juntamente com as quitinases, as  $\beta$ -1,3-glucanases representam hidrolases antifúngicas, as quais atuam sinergisticamente para inibir o crescimento fúngico. Além disso,  $\beta$ -1,3-glucanases liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como elicitores de defesas do hospedeiro (CUTT; KLESSIG, 1992).

Na indução de resistência, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases agem de forma conjunta. Uma pequena quantidade de  $\beta$ -1,3-glucanases é sintetizada e excretada para a lamela média (espaço intercelular), e, com o crescimento fúngico neste espaço, esta enzima começa a degradar o tecido da parede celular do fungo, e os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como exoelicitores, induzindo a síntese de grande quantidade de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases que são acumuladas nos vacúolos. A partir do momento em que o fungo consegue penetrar na célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação de grande quantidade destas enzimas reprimindo a ação do patógeno (MAUCH; STAEHELIN, 1989). Xue; Charest e Jabaji-Hare. (1998) induziram resistência em feijoeiro a partir da inoculação com *Rhizoctonia* binucleada não patogênica, e, a presença do fungo aumentou a atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase associado a proteção de 80% contra *Rhizoctonia solani*, e de até 100% contra *Colletotrichum lindemuthianum*. Cachinero et al. (2002) induziram resistência em grão-de-bico, com a inoculação de isolados de *F. oxysporum* não patogênicos com o objetivo de controlar *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, um patógeno causador de murcha na cultura, e, observaram aumento na atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, bem como a redução da severidade da murcha. Nandakumar et al. (2001), a partir da inoculação de *P. fluorescens* em arroz, observaram a redução da severidade da queima-da-bainha causada por *R. solani* associado ao aumento na atividade de quitinase. Com o uso de indutores químicos, Dann et al. (1996) induziram resistência em feijoeiro com INA na primeira folha verdadeira e observaram aumento na atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase tanto nesta folha, quanto no primeiro e segundo trifólios. Buzi et al. (2004) observaram aumento na atividade de quitinase em melão que apresentava resistência induzida por ASM e MeJa, mas não com AS. Bokshi; Morris e Deverall (2003) observaram aumento da  $\beta$ -1,3-glucanase em batata com resistência induzida por ASM.

### 2.1.7 Cultura do feijoeiro

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), dicotiledônea originária das Américas, pertencente a família Leguminosae, é uma planta herbácea, que pode apresentar hábito de crescimento determinado ou indeterminado, com ciclo anual variando de 60 a 120 dias (SANTOS; GAVILANES, 2006). É uma cultura de grande importância para o Brasil,

pois é um dos componentes básicos da alimentação do povo, independente das classes sociais (PESSANHA et al., 1972). Considerado um prato quase obrigatório da população rural e urbana, é uma das mais importantes fontes de proteínas (BORÉM; CARNEIRO, 2006; YOKOYAMA; BANNO; KLUTHCOSKI, 1996; YOKOYAMA; STONE, 2000), carboidratos e ferro (BORÉM; CARNEIRO, 2006).

Devido a boa adaptação do gênero *Phaseolus* às mais variadas condições edafoclimáticas brasileiras (YOKOYAMA; BANNO; KLUTHCOSKI, 1996), o Brasil é o maior produtor mundial de feijão, com uma produção superior a 3 milhões de toneladas (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006). Porém, esta produção tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno (YOKOYAMA; STONE, 2000), que consome per capita 16,55 kg ano<sup>-1</sup>, fazendo com que o Brasil importe feijão principalmente da Argentina e Bolívia (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006).

Na maioria das regiões produtoras tem ocorrido baixa produtividade, devido a problemas fitossanitários associados a métodos culturais inadequados e o esgotamento progressivo da fertilidade do solo (BORÉM; CARNEIRO, 2006). O rendimento médio do feijoeiro no Brasil gira em torno de 790 kg ha<sup>-1</sup> (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2006), muito inferior à produtividade potencial da cultura que em condições de pesquisa chega a 6.000 kg ha<sup>-1</sup> (WHITE; IZQUIERDO, 1991).

#### **2.1.7.1 Resistência induzida em feijoeiro**

O feijoeiro tem sido estudado quanto a capacidade de se induzir resistência contra fungos (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2002; CAMPOS et al., 2003; DANN; DEVERALL, 1995; IRITI; FAORO, 2003a, b; MEYER; HÖFTE, 1997; ONGENA et al., 2002; XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998), bactérias (DANN; DEVERALL, 1995; SOARES; MARINGONI, 2002) e vírus (GÁLIS; SMITH; JAMENSON, 2004), utilizando-se para isto, indutores bióticos, como rizobactérias (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2002; MEYER; HÖFTE, 1997; ONGENA et al., 2002), patógeno avirulento (XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998) ou indutores abióticos, como ASM (BIGIRIMANA; HÖFTE, 2002; SOARES; MARINGONI, 2002; IRITI; FAORO, 2003a, b), INA (DANN; DEVERALL, 1995; DANN et al., 1996) e AS (CAMPOS et al., 2003; GÁLIS; SMITH; JAMENSON, 2004).

Contra fungos, Dann e Deverall (1995) induziram plantas de feijão com INA aos nove dias, quando apresentavam apenas o primeiro par de folhas e inocularam *Colletotrichum lindemuthianum* aos 16, 21 ou 25 dias, correspondendo ao tempo necessário para que o primeiro, segundo e terceiro trifólio, respectivamente, estivessem completamente expandidos. Os autores observaram redução de 97,6% do número de lesões e 91,6 % de redução no número de pontuações (*flecks*) para o primeiro trifólio. Para o segundo e terceiro trifólios houve a ocorrência apenas de pontuações, com uma redução de 94,4 e 98,1% respectivamente, considerando-se um elevado aumento na resistência a este patógeno. Quando os mesmos autores inocularam da mesma forma *Uromyces appendiculatus*, observaram redução de cerca de 66 % no primeiro trifólio, 85,2 no segundo e de 99% no terceiro. No entanto, ao se inocular *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* ou *Rhizoctonia* sp. não houve diferença entre os tratamentos. De acordo com os autores, a ausência de resistência aconteceu devido aos patógenos iniciarem o processo de infecção na raiz e o sinal da resistência induzida ser translocado principalmente em direção às folhas mais novas. Por outro lado, Birigimana e Höfte (2002) testaram diferentes doses de ASM, mergulhando-se as folhas em soluções contendo 0,1; 1; 10; 100 e 1000  $\mu\text{M}$ , sendo que três dias após inocularam *C. lindemuthianum*, a partir de suspensão de esporos. Os autores observaram que o aumento da resistência era dependente da dose utilizada. Porém, doses de 100 e 1000  $\mu\text{M}$  tornaram as folhas menores e verde escuras, o que os autores consideraram como fitotoxidez. Iriti e Faoro (2003b) utilizaram a dose de 300  $\mu\text{M}$ , visto que, em trabalhos anteriores demonstrou máxima eficiência sem causar sintoma de fitotoxidez, e, inocularam *U. appendiculatus* 1, 3, 7 ou 14 dias após a indução e observaram redução de 54,2, 81,1, 99,9 e 100% no número de pústulas, respectivamente e quando se efetuou 2 ou 3 aplicações antes da inoculação a redução foi de 99,6 e 100%, respectivamente.

Com o uso de indutores bióticos, Ongena et al. (2002) induziram resistência em feijoeiro com *Pseudomonas putida* (isolado BTP1) e *P. aeruginosa* (isolado KMPCH) contra *Botrytis cinerea*, onde observaram redução nos sintomas da doença de 42 e 35%, respectivamente. Os autores consideraram que houve indução de resistência, uma vez que as bactérias indutoras e o patógeno foram inoculados em partes diferentes da

planta. Bigirimana e Höfte (2002) observaram que diferentes rizobactérias induziram resistência através de diferentes rotas sinalizadoras. O isolado de *P. aeruginosa* KMPCH, que sintetiza AS e por conseqüência ativa essa via de sinalização, alterou o nível de resistência de um cultivar suscetível. Já o isolado de *P. fluorescens* (WCS417), um conhecido ativador da rota sinalizadora do AJ e ET e independente do AS em *Arabidopsis*, induziu resistência em todas as condições.

Contra bactérias fitopatogênicas, Soares e Maringoni (2002) não observaram proteção contra *Curtobacterium flaccunfaciens* pv. *flaccunfaciens*, causador da murcha-de-curtobacterium no cultivar IAC-Carioca, tanto em tratamento de sementes quanto em aplicação foliar do ASM. Dann e Deverall (1995) também não observaram ocorrência de resistência induzida por INA pulverizado sobre o primeiro par de folhas contra *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. No entanto, os autores consideraram que o método de inoculação foi muito severo, sendo efetuado por injeção de suspensão no espaço intercelular do tecido foliar.

Contra vírus, Gális; Smith e Jamenson (2004) observaram que plantas de feijão que foram induzidas com AS e inoculadas com o vírus do mosaico do trevo branco (WCIMV), 12 horas após mostraram um nítido impedimento de multiplicação do vírus e Clarke et al. (1998) com a aplicação de 0,25 nM de AIA (auxina), 25 nM de dihidrozeatina (citocinina), 0,25 nM de ACC (1-aminociclopropano 1-acido carboxílico), 0,25 nM AJ e 100 µM de AS inibiram a replicação do vírus na planta, embora não esteja claro o mecanismo em cada tratamento que impediu a multiplicação do vírus.

Os mecanismos de resistência estudados em feijoeiro envolvem a reação de hipersensibilidade, síntese de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (IRITI; FAORO, 2003b) e aumentos nas atividades das peroxidase (XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998), quitinases e β-1,3-glucanases (DANN et al., 1996; MAUCH; STAEHELIN, 1989; XUE; CHAREST; JABAJI-HARE, 1998).

### **2.1.8 Crestamento bacteriano comum**

O crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin et al. e por sua variante fuscans (PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006), é uma doença cosmopolita que ocorre na cultura do feijoeiro,

principalmente nas regiões úmidas e quentes do globo. No Brasil, tem sido problemática nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e na Região Centro Oeste, principalmente na safra das águas, período quente e úmido, podendo chegar a perdas de até 45% (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

#### **2.1.8.1 Sintomas**

Os sintomas da doença são visíveis em toda parte aérea da planta. Inicialmente, são observadas manchas encharcadas nas folhas que aumentam em tamanho e progridem para necróticas e podem apresentar halo amarelo ao redor. As manchas podem ser encontradas distribuídas pelo limbo foliar ou concentradas nas margens. No caule são observadas manchas inicialmente encharcadas, que se tornam avermelhadas, de onde, pode exudar pus bacteriano de coloração amarela. Nas vagens, as lesões variam em forma e tamanho, sendo inicialmente circulares e encharcadas, tornando-se necróticas e avermelhadas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006; VIEIRA, 1988).

#### **2.1.8.2 Etiologia**

*X. axonopodis* pv. *phaseoli* é uma bactéria baciliforme, Gram-negativa e possui um flagelo polar, sendo cultivada em meio nutriente-ágar contendo glicose ou sacarose, formando colônias amareladas de bordos lisos, convexas, brilhantes e circulares. Apresenta metabolismo oxidativo da glicose, aeróbica, hidrolisa amido, esculina, gelatina, caseína e Tween-80. Não reduz nitrato à nitrito, não utiliza asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio, é oxidase e urease negativa e catalase positiva e sua temperatura para crescimento é de 37 °C. Sobrevive principalmente nas sementes (de 2 a 15 anos) no estado hipobiótico interna ou externamente, sem perder sua patogenicidade. Nos restos culturais, a sua sobrevivência é variável, se permanecer na superfície pode sobreviver por até 180 dias, mas se os restos culturais forem incorporados ao solo, esse período não passa de 90 dias (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Sua sobrevivência pode-se dar também em plantas alternativas ou como epífitas (PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006). A principal forma de disseminação é por sementes contaminadas, porém na lavoura a população epifítica pode ser

disseminada por respingos ou por alguns insetos que a carregam em seu corpo (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006).

### **2.1.8.3 Controle**

O controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro é realizado através de várias medidas simultaneamente. O uso de sementes sadias é a principal medida, além da incorporação de restos culturais quando o sistema de plantio permite, e o uso de variedades resistentes (porém, a grande maioria das variedades disponíveis são suscetíveis). Não se recomenda trabalhar em campos que apresentam focos da doença, se as plantas estiverem molhadas, com o objetivo de reduzir a disseminação da bactéria. O uso de controle químico é contraditório, uma vez que, nem sempre pulverizações na lavoura produzem resultados satisfatórios (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006).

### **2.1.9 O mofo branco**

O mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, também é conhecido por murcha-de-esclerotinia ou podridão aquosa (VIEIRA, 1988), ocorre na maioria dos países produtores, principalmente nas regiões de clima temperado e subtropical (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). É considerada atualmente a doença mais destrutiva nas áreas irrigadas do Brasil, notadamente nos plantios realizados nas safras de outono-inverno-primavera (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Na literatura mundial é mencionado como causador de doença em 374 espécies de plantas suscetíveis, compreendendo 237 gêneros e 65 famílias (VIEIRA, 1988).

#### **2.1.9.1 Sintomas**

O fungo pode afetar toda parte aérea da planta, causando lesões inicialmente pequenas e aquosas. Estas lesões aumentam de tamanho rapidamente, tomando todo o órgão afetado. Posteriormente, as partes afetadas perdem cor, tornando-se amareladas e marrons, produzindo uma podridão mole nos tecidos. Em condições de alta umidade, desenvolve-se sobre as lesões, um micélio branco e cotonoso do fungo,



causando a formação de escleródios visíveis a olho nu (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006; VIEIRA, 1988).

### **2.1.9.2 Etiologia**

O fungo pertence a subdivisão Ascomycotina, produz apotécios de 2 a 10 mm de diâmetro, com formato chato a côncavo quando jovens. Os ascos são cilíndricos, medindo de 7 a 10 µm de diâmetro por 112 a 156 µm de comprimento. Os ascósporos são elipsóides, hialinos, com dimensões de 4-6 por 9-14 µm. O patógeno forma escleródios pretos irregulares com 2-15 por 2-30 mm, os quais podem germinar e produzir micélio e apotécio (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). A faixa de temperatura ideal para o fungo está entre 11 e 20 °C e, em ambiente com solo úmido por mais de uma semana são condições propícias para a doença (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Porém, se as condições não forem favoráveis, o escleródio pode permanecer dormente no solo por vários anos (VIEIRA, 1988)

### **2.1.9.3 Controle**

Diferentes medidas de controle devem ser utilizadas, como: uso de sementes livres de patógeno; evitar o tráfego de pessoas e equipamentos provenientes de áreas infestadas; rotação de culturas com gramíneas pode ajudar a reduzir o inóculo inicial; destruição dos resíduos culturais infectados; solarização do solo quando possível para diminuir a viabilidade dos escleródios; controle da água de irrigação, evitando o encharcamento; uso de menor densidade de sementes e de plantas de porte ereto em áreas com problemas para facilitar a aeração e penetração de raios solares; uso de fertilizantes nitrogenados devem ser feitos com moderação (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; CANTERI et al., 1999; PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006; VIEIRA, 1988). O controle químico em geral não é eficaz (CANTERI et al., 1999), no entanto, a densidade de inóculo no solo determina a eficiência do controle químico da doença (PAULA JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006).

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Obtenção e manutenção dos microrganismos**

*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi isolada de plantas de feijão contaminadas, sendo cultivada em meio 523 de Kado e Heskett (1970), constituído de 10 g de sacarose, 8 g de caseína ácida hidrolisada, 4 g de extrato de levedura, 2 g de  $K_2HPO_4$ , 0,3 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 15 g de ágar em 1000 mL de água destilada. As culturas foram mantidas a 25 °C no escuro por período de 96 h, sendo que para o processo de inoculação foi preparada suspensão de células ajustadas para  $10^8$  células  $mL^{-1}$ . A manutenção da bactéria foi efetuada através do método simples de armazenamento de bactérias fitopatogênicas a -20 °C (MARIANO; ASSIS, 2000).

O isolado RSR-01 de *Bacillus cereus*, com comprovada ação de indução de resistência, foi fornecido pelo Dr. Reginaldo da Silva Romeiro do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, o qual foi cultivado em meio 523 de Kado e Heskett (1970). A conservação por longo prazo desta também foi efetuada pelo método de armazenamento a -20 °C.

### **2.2.2 Produção das plantas em casa de vegetação**

Plantas de feijão foram cultivadas em vasos de 4 L contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica (2:1:2) autoclavados (uma hora a 121 °C, sendo repetida a operação 24 h após) e mantidos em casa de vegetação. As sementes de feijão do cultivar Carioca Tybatã foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

#### **2.2.2.1 Cultivo em casa de vegetação com aplicação dos indutores**

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x4, considerando dois indutores e quatro formas de aplicação. Os indutores foram representados por acibenzolar-S-metil (ASM) e *B. cereus*. Assim, as plantas receberam os tratamentos da seguinte forma: para cada indutor foram efetuadas aplicações no Tratamento 1 aos 14, 28, 42 e 56 dias após a emergência (dae); Tratamento 2 aos 14, 28 e 42 dae; Tratamento 3 aos 14 e 42 dae; Tratamento 4 plantas que receberam água destilada (controle). Seis sementes foram semeadas em cada vaso, sendo mantidas duas plantas aos quinze dias, após a emergência. Para as avaliações de parâmetros fisiológicos e

bioquímicos, cada tratamento foi composto de quatro repetições, totalizando 32 unidades experimentais. Para as avaliações de parâmetros de produção e produtividade, cada tratamento foi composto de oito repetições totalizando 64 unidades experimentais. Cada experimento foi conduzido por pelo menos duas vezes.

Plantas sem a aplicação dos indutores (controle) foram pulverizadas com água destilada. O ASM foi aplicado pulverizando-se 10 mL de solução por planta, na concentração de 50 mg i.a. L<sup>-1</sup> do produto Bion® (Syngenta), e o *B. cereus* foi utilizado na concentração de 10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>, pulverizando-se 10 mL por planta.

### 2.2.3 Cultivo a campo

O feijão foi cultivado a campo, sendo as plantas tratadas com os dois indutores (ASM ou *B. cereus*) em combinações idênticas ao item 2.2.2.1. As parcelas foram compostas de quatro linhas de 5 m com espaçamento 0,5 m entrelinhas, correspondendo a 10 m<sup>2</sup>, sendo a área útil do experimento representada pelas duas linhas centrais descontando-se 0,5 m em cada extremidade, correspondendo a 4 m<sup>2</sup>. As plantas receberam adubação uniforme (NPK), nas quantidades de 30 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio, 105 kg ha<sup>-1</sup> de fósforo e 60 kg ha<sup>-1</sup> de potássio, para fornecer condição de ótima fertilidade, adequado aos padrões de alta tecnologia.

### 2.2.4 Avaliação de doença

Em casa de vegetação foram cultivadas plantas de feijão, conforme item 2.2.2., procedendo-se aos 10 dias o tratamento com *B. cereus* (suspensão com 10<sup>8</sup> UFC), ASM (50 mg i.a. mL<sup>-1</sup>) e água destilada (controle), todos na quantidade de 10 mL por planta, pulverizados nas primeiras folhas verdadeiras. Três dias após os tratamentos, quando a planta já apresentava a primeira folha trifoliolada, foi inoculado *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a partir da pulverização de suspensão de células (10<sup>8</sup> ufc) preparada com colônia de quatro dias. Aos 15 dias após a inoculação foi avaliada a severidade do crestamento bacteriano a partir da quantificação da área lesionada, com o auxílio do software QUANT v. 1.0 (UFV).

## **2.2.5 Análises bioquímicas e fisiológicas**

### **2.2.5.1 Obtenção e armazenamento das amostras de tecido foliar**

Para a realização das análises, em cada amostragem, folhas de feijoeiro completamente expandidas foram coletadas das plantas de cada tratamento em casa de vegetação, sendo as coletas efetuadas 14, 21, 35, 49 e 63 dias após a emergência. Essas amostras foram acondicionadas em geladeiras de isopor contendo gelo e transportadas imediatamente ao laboratório para pesagem e processamento, visando o armazenamento em congelador ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para posterior análise experimental.

### **2.2.5.2 Fenóis totais**

Amostras de tecido vegetal, obtidas conforme item 2.2.5.1, foram trituradas em nitrogênio líquido e secas por 6 h em liofilizador (*Integrated SpeedVac System* modelo ISS 100, marca Savant). Deste material liofilizado, 30 mg foram transferidas para tubo eppendorf de 2 mL e homogeneizadas com 1,5 mL de metanol 80% e extraídas sob agitação por 15 h em agitador rotativo, protegido da luz e em temperatura ambiente. O extrato metanólico foi centrifugado a  $12.000g$  por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo eppendorf e o resíduo foi utilizado para determinação lignina. Os compostos fenólicos totais foram determinados pipetando-se 150  $\mu\text{L}$  do extrato metanólico, misturando-se 150  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N e mantido em temperatura ambiente por 5 min, adicionando-se então 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M, sendo homogeneizado e mantido por 10 min em temperatura ambiente. A mistura foi então homogeneizada com 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e deionizada e mantido a temperatura ambiente por uma hora. A absorbância da reação foi lida a 725 nm. Os valores de absorbância foram calculados com base em curva de catecol e os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente mg de catecol  $\text{g}^{-1}$  de tecido seco (RODRIGUES et al., 2005)

### **2.2.5.3 Lignina**

Um volume de 1,5 mL da água destilada foi adicionado ao resíduo proveniente do item 2.2.5.2., homogeneizado e centrifugado a  $12.000g$  por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 h. O resíduo seco insolúvel em álcool,

contendo lignina e ácidos fenólicos esterificados da parede celular, foi utilizado para determinação de lignina, de acordo com metodologia de Barber e Ride (1988). Para tanto, um volume de 1,5 mL de solução contendo ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10) foi adicionado ao resíduo. Os tubos eppendorf foram agitados suavemente para hidratar o resíduo e então colocados em banho-maria a 100 °C por 4 h. Após, os tubos foram colocados em gelo para resfriar rapidamente por 10 min e então centrifugados a 12.000g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e deionizada e novamente centrifugado a 10.000g por 10 min. Após isto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5 M, sendo a mistura agitada em agitador rotativo por 15 h em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo eppendorf, sendo após adicionado 200 µL de HCl concentrado ao sobrenadante e mantido em câmara fria (4 °C) por 4 h para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. A seguir, a mistura foi centrifugada a 10.000g por 10 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 2 mL de NaOH 0,5 M. A absorbância desta solução foi determinada a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em mg de lignina por grama de tecido seco (RODRIGUES et al., 2005).

#### **2.2.5.4 Obtenção dos extratos protéicos**

As amostras de folhas (0,5 g) foram homogeneizadas mecanicamente em 4 ml de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), com auxílio de almofariz. O homogenato foi centrifugado a 20.000g durante 25 min a 4 °C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato enzimático, para a determinação da atividade da peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase, protease e conteúdo protéico.

#### **2.2.5.5 Atividade de peroxidase**

A atividade da peroxidase foi determinada à 30 °C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A mistura da reação continha 0,10 mL do

extrato protéico (conforme item 2.2.5.4.) e 2,9 mL de solução com 250  $\mu\text{L}$  de guaiacol e 306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250  $\mu\text{L}$  de guaiacol e 306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), sendo a determinação de proteínas efetuada como descrito no item 2.2.5.11.

#### **2.2.5.6 Atividade de quitinase**

A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4  $\text{mg mL}^{-1}$ , Loewe Biochemica GmbH) (STANGARLIN; PASCHOLATI; LABATE, 2000). Para tanto, 200  $\mu\text{L}$  do extrato protéico (conforme 2.2.5.4.) foi misturado com 600  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão de extração e 200  $\mu\text{L}$  de “CM-chitin-RBV” (2,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g / 5 min. A absorvância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína, descontando-se os valores de absorvância do controle (800  $\mu\text{L}$  de tampão de extração + 200  $\mu\text{L}$  de “CM-chitin-RBV”).

#### **2.2.5.7 Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase**

Para a determinação espectrofotométrica da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases nos extratos foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilcurdlan-remazol brilhante azul (CM-Curdlan-RBB 4  $\text{mg mL}^{-1}$ , Loewe Biochemica GmbH), de acordo com metodologia desenvolvida por Wirth e Wolf (1992) e com o procedimento descrito por Guzzo e Martins (1996). Para tanto, 200  $\mu\text{L}$  do extrato protéico (conforme 2.2.5.4) foi misturado com 600  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão de extração e 200  $\mu\text{L}$  de CM-curdlan-RBB (4,0  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Após incubação por 20 min a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo por 10 min e centrifugação a 10.000g por 5 min. A absorvância a 600 nm do sobrenadante foi

determinado tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ , descontando-se os valores de absorvância do controle (800  $\mu\text{L}$  de tampão de extração + 200  $\mu\text{L}$  de “CM-curdlan-RBB”).

#### **2.2.5.8 Atividade de polifenoloxidase**

A atividade das polifenoloxidases (PFO) foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). O ensaio consistiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima em estudo. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 900  $\mu\text{L}$  do substrato e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático (Item 2.2.5.4). A temperatura de reação foi de 30 °C e as leituras em espectrofotômetro, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **2.2.5.9 Atividade de fenilalanina amônia-liase**

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A mistura da reação, incubada a 40°C por 2 h, continha 100 $\mu\text{l}$  do extrato protéico (Item 2.2.5.4.), 400 $\mu\text{L}$  do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 $\mu\text{l}$  de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A absorvância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle (esse controle correspondia a uma mistura 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico e 900  $\mu\text{L}$  de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8 ). As leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{g}$  de ácido *trans*-cinâmico  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **2.2.5.10 Atividade de proteases**

Para avaliação da atividade proteolítica foi de acordo com a metodologia utilizada por Fialho (2004), para tanto, 0,5 g de caseína foi dissolvida em 40 mL de água destilada e deixada sob agitação durante 20 min. Em seguida foi adicionado 1 mL de NaOH 1 M e 2,5 mL de Tris 1 M. Após um período de agitação, com a caseína completamente dissolvida, o pH foi ajustado para 7,8 com ácido fosfórico 85%. O volume foi completado para 100 mL obtendo-se assim a solução final de substrato 0,5% (m/v).

Para a reação, 500  $\mu$ L do substrato foi incubado com 200  $\mu$ L da amostra a 30 °C durante 30 min. A reação foi interrompida através da adição de 650  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v), seguida de centrifugação a 10000g por 15 min. A atividade foi determinada através da leitura de absorbância a 280 nm do sobrenadante contra branco preparado através da adição de TCA previamente ao acréscimo da amostra. A leitura da absorbância foi efetuado a 280 nm e o resultado expresso em unidades de absorbância  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### **2.2.5.11 Proteínas totais**

O teste de Bradford (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras. Para tanto, foram adicionados a cada 0,8 mL do sobrenadante, sob agitação, 0,2 mL do reagente de Bradford. Após 5 min, foi efetuada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes  $\mu$ g de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra ( $\mu\text{g}$  proteína  $\text{mL}^{-1}$ ), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$ .

#### **2.2.5.12 Açúcares redutores**

O conteúdo de açúcares redutores foi determinada pelo método de Lever (1972), cuja reação envolveu 500  $\mu$ L de extrato (item 2.2.5.4) adicionando-se 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% em NaOH (HAPH). A mistura foi mantida em água em ebulição sob banho-maria por 5 min e resfriada, determinando-se



então a absorvância a 410 nm. As leituras de absorvância foram plotadas em curva padrão para a glicose e o resultado expresso em  $\mu\text{g}$  de glicose  $\text{g}^{-1}$  de tecido fresco.

#### **2.2.5.13 Respiração e fotossíntese**

A respiração e fotossíntese foram avaliadas por métodos não destrutíveis, conforme utilizado por Ribeiro; Machado e Oliveira (2003), sendo que a medida do  $\text{CO}_2$  e fluxo de vapor d'água foram obtidos em folhas maduras e completamente expandidas, com o auxílio de um medidor infravermelho de gás (LI-6400, LICOR, Lincoln, NE USA) em sistema aberto. A condição ambiental para o aparelho foi a mesma na qual as plantas cresceram. A assimilação de  $\text{CO}_2$  foi medida pela manhã, entre 8 e 10 h, sendo armazenada quando o coeficiente de variação do dado foi menor que 1%. A respiração foi medida pela manhã, entre 10 e 12 horas com a fonte luminosa desligada sendo armazenado o valor de liberação de  $\text{CO}_2$  quando o coeficiente de variação foi menor que 1%.

#### **2.2.6 Parâmetros de produção e qualidade de grãos**

Em casa de vegetação, foram coletados dados de massa e número de grãos produzidos por planta, número de vagens e número de grãos por vagem. A massa seca total foi obtida pela pesagem das plantas coletadas aos 14, 21, 35, 49 e 63 dias após a emergência, de cada vaso, após permanência do material a 60 °C até peso constante.

A qualidade dos grãos foi avaliada a partir da análise centesimal, determinando-se umidade, proteína bruta, extrato etéreo e cinza da matéria seca, de acordo com a metodologia indicada pela Associação Oficial de Química Analítica - AOAC (1995), e as fibras solúvel e insolúvel de acordo com a metodologia proposta por Asp et al. (1983).

Para a determinação de umidade e obtenção da matéria seca, as amostras foram submetidas à secagem em estufa regulada a 105 °C, até peso constante (aproximadamente 14 h), sendo a umidade obtida por diferença. O teor de proteína foi determinado pela quantificação do nitrogênio total da amostra, utilizando-se o destilador microkjeldahl, sendo que no cálculo da conversão do nitrogênio em proteínas, utilizou-se o fator 6,25. O extrato etéreo foi determinado utilizando-se o extrator de Soxhlet. Na extração foi utilizado como solvente o éter etílico à temperatura de 45-50°C em refluxo

contínuo da amostra durante 6 h. Recuperado o éter etílico, os tubos foram retidos e colocados em estufa por 20 min a 100°C, depois disso os tubos esfriaram em dessecador e foram pesados, obtendo-se a quantidade de lipídeos por diferença de peso do tubo.

A determinação da fração de cinzas se deu por incineração das amostras em mufla à temperatura de 600 °C por 4 h.

O teor de fibra dietética foi determinado de acordo com o método de Asp et al. (1983). Esse ensaio determina o conteúdo de fibra solúvel e insolúvel dos alimentos usando uma combinação dos métodos enzimáticos e gravimétricos. As amostras desengorduradas foram tratadas com  $\alpha$ -amilase estável ao calor e então digeridas enzimaticamente com pepsina e pancreatina. O etanol foi adicionado para precipitar a fibra solúvel, sendo todos os resíduos filtrados e lavados com etanol e acetona. Após a secagem, os resíduos foram pesados e analisou-se o conteúdo de proteína e cinza. O total de fibra foi calculado com base no peso do resíduo menos o peso da proteína e da cinza.

Os carboidratos foram obtidos por diferença, ou seja,  $100\% - (\% \text{ proteína} + \% \text{ umidade} + \% \text{ fibra} + \% \text{ cinza} + \% \text{ extrato etéreo})$ .

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Avaliação da severidade do crestamento bacteriano**

Com o uso dos dois indutores, ASM e *B. cereus*, pôde-se confirmar a ocorrência do fenômeno da indução de resistência em feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* com base na redução do crestamento bacteriano comum (Tabela 1). A proteção proporcionada pelo ASM foi significativa em relação ao controle, porém, também apresentou diferença significativa em relação ao indutor *B. cereus*, o qual apresentou valor intermediário.

Tabela 1 - Severidade e percentual de controle do crestamento bacteriano causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro cv. Carioca Tybatã com resistência induzida por acibenzolar-S-metil (ASM) ou *Bacillus cereus* três dias antes da inoculação comparados com plantas tratadas apenas com água destilada. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$

Tratamento	Severidade área lesionada (%) <sup>*</sup>	Controle (%)
ASM	4,7 ± 1,1 a	79,1
<i>Bacillus cereus</i>	14,2 ± 2,3 b	36,8
Controle	22,5 ± 3,2 c	-
C.V. (%)	58,4	
Média geral	13,8	

\* Valores com letras distintas diferem pelo teste de Tukey a 1%. Média ± erro padrão.

### 2.3.2 Avaliação da severidade do mofo branco no campo

A partir da contagem das plantas doentes pôde-se observar certa tendência à redução da incidência, na medida em que se aumentava o número de aplicações de ASM (Tabela 2). No entanto, não houve diferença significativa, visto que o coeficiente de variação foi bastante alto (37,1%). O alto coeficiente de variação está associado principalmente a desuniformidade de distribuição do inóculo na área, visto que se trata de infecção natural. Os tratamentos com suspensão de células de *B. cereus* não apresentaram tendência em aumentar a proteção conforme o número de aplicações.

Tabela 2 - Incidência e percentual de controle do mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, em infecção natural, na cultura do feijoeiro cv. Carioca Tybatã com resistência induzida por *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>) aplicados 4, 3, 2 ou nenhuma (0) vez ao longo do ciclo da cultura. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,5}$

Indutor	Número de aplicações	Incidência (%) *	Controle (%)
<i>B. cereus</i>	0	47,5 ± 11,6	-
	2	40,0 ± 13,9	15,8
	3	23,4 ± 12,0	50,5
	4	42,5 ± 10,5	10,5
ASM	0	46,3 ± 11,6	-
	2	37,5 ± 6,6	19,0
	3	33,8 ± 10,5	27,0
	4	26,0 ± 8,5	43,8
C.V. (%)		30,4	
Média geral		37,1	

\* Média ± erro padrão

### 2.3.3 Atividade de enzimas relacionadas a indução de resistência

A atividade das enzimas relacionadas a indução de resistência como peroxidase, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase foram avaliadas obedecendo ao esquema trifatorial considerando-se 2 indutores (*B. cereus* e ASM) x 4 quantidades de aplicação (0, 2, 3 e 4 aplicações) x 5 épocas de coleta ao longo do ciclo da cultura (0, 7, 21, 35 e 49 dias após o início dos tratamentos), sendo o comportamento dessas variáveis demonstrado a partir do desdobramento da interação tripla.

#### 2.3.3.1 Peroxidase

A atividade de peroxidase foi influenciada em função do tempo ( $P \leq 0,01$ ), em função do número de aplicações ( $P \leq 0,01$ ) e em função do indutor ( $P \leq 0,05$ ). Para o indutor biótico somente o tratamento com 4 aplicações exibiu diferença estatística aos 49 dias após o início dos tratamentos ( $P \leq 0,01$ ). No entanto, os tratamentos mostraram tendência em aumentar a atividade da peroxidase quanto maior era o número de aplicações (Figura 1 – *B. cereus*). Para o ASM esse aumento da atividade foi mais acentuado, apresentando diferença estatística após a terceira aplicação (35 dias após

início dos tratamentos) para o tratamento com 3 aplicações e após a quarta aplicação para os tratamentos com 3 e 4 aplicações (Figura 1 - ASM).

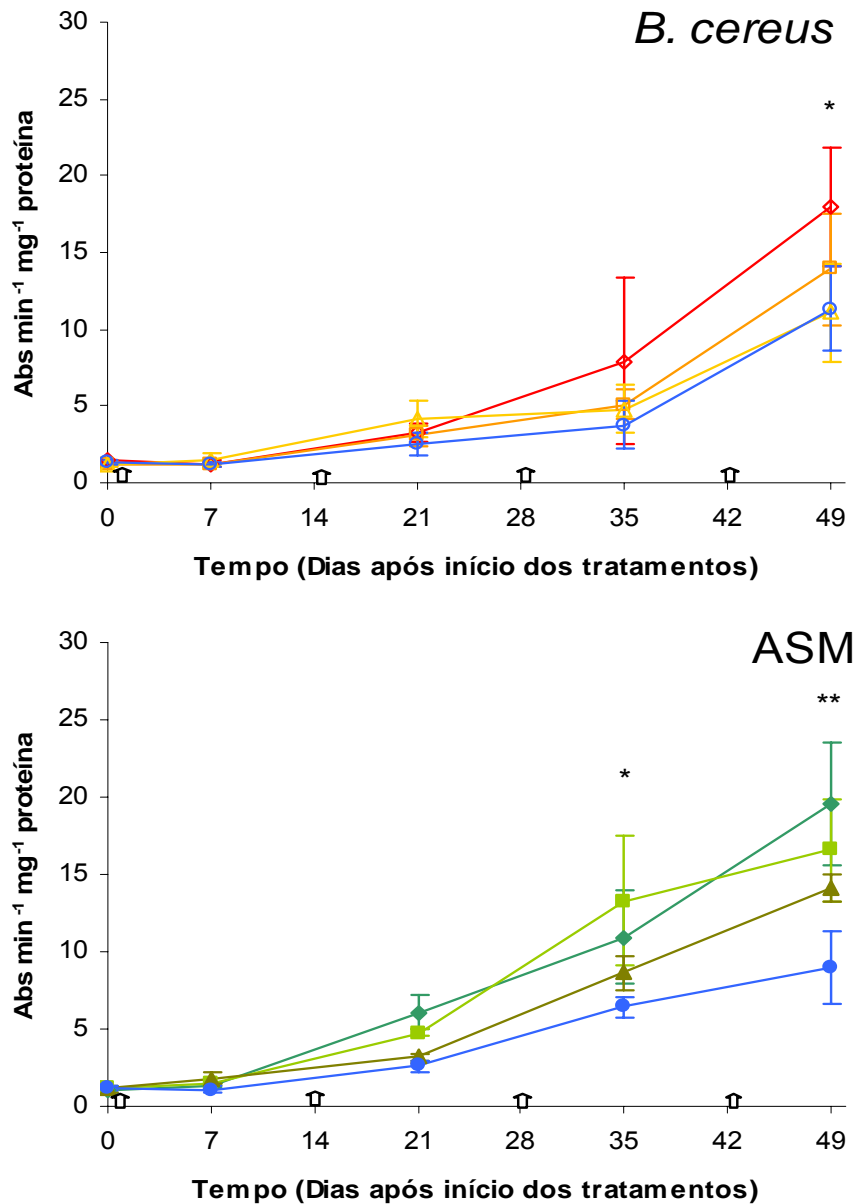


Figura 1 – Atividade de peroxidase em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \* Indica diferença estatística a 5% e \*\* a 1% pelo teste de Tukey

### 2.3.3.2 Quitinase

A atividade de quitinase não foi alterada significativamente com o indutor biótico (Figura 3 - *B. cereus*). Porém, com a aplicação do indutor abiótico (ASM), nota-se a elevação da atividade alcançando diferença significativa a 1% após a primeira aplicação e segunda aplicação ( $P \leq 0,01$ ) e a 5% após a terceira aplicação ( $P \leq 0,05$ ). Interessantemente, nota-se que após a primeira aplicação, onde todos os tratamentos receberam a mesma dose, os mesmos apresentavam aumento significativo na atividade em relação ao controle. Após a segunda aplicação, os tratamentos que receberam a segunda dose (3 e 4 aplicações) continuaram a aumentar a atividade, no entanto, o tratamento com 2 aplicações de ASM, que foi pulverizado com água destilada, voltou a níveis semelhantes ao controle. Após a terceira aplicação, onde todos os tratamentos receberam sua dose, apenas o tratamento com 3 aplicações foi significativamente maior do que o controle. Após a quarta aplicação, as atividades foram muito semelhantes não ocorrendo diferença (Figura 3 - ASM).

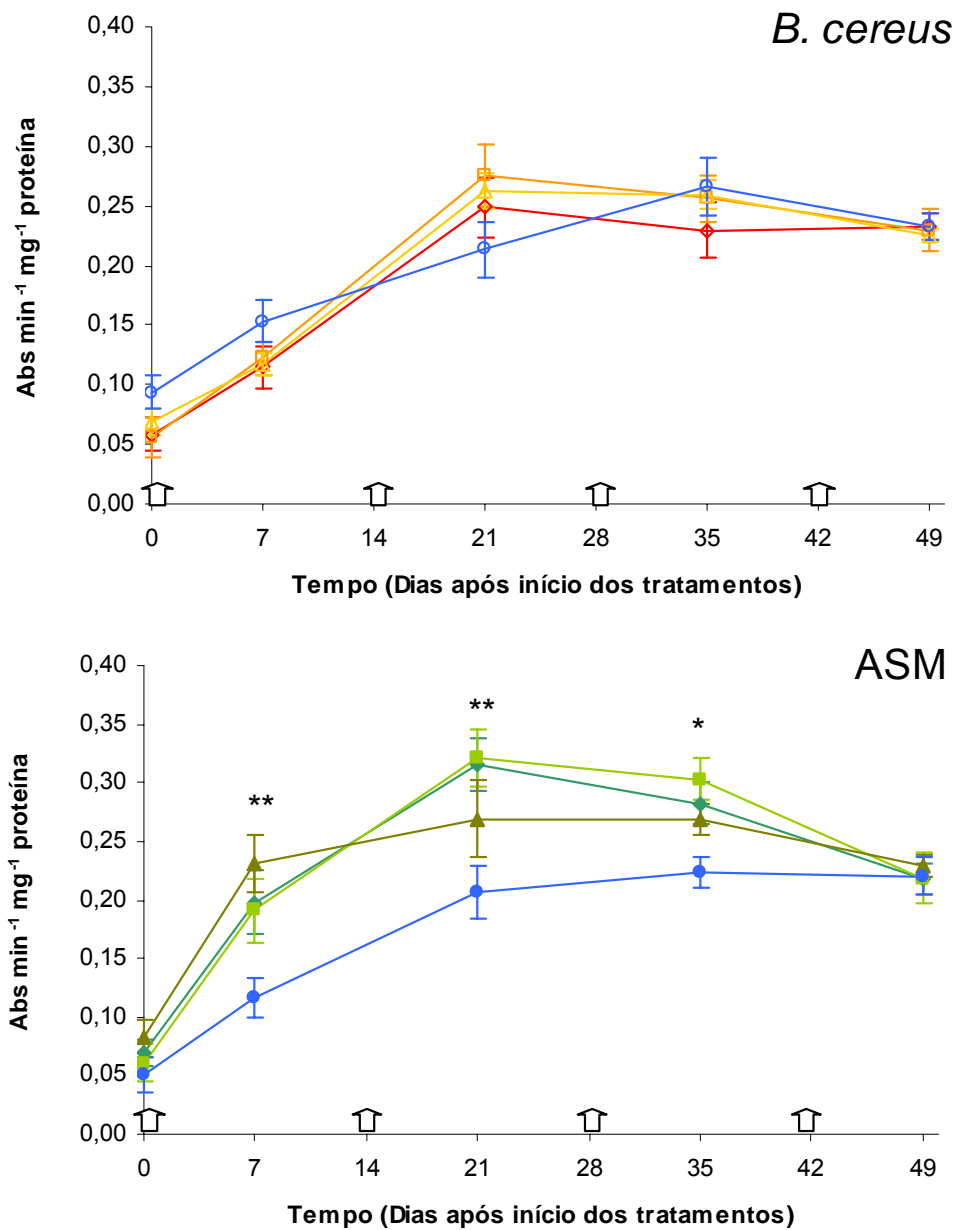


Figura 2 – Atividade de quitinase em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \* Indica diferença estatística a 5% e \*\* a 1% pelo teste de Tukey. Valores do gráfico representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005

### 2.3.3.3 $\beta$ -1,3-Glucanases

A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase comportou-se de forma muito semelhante a quitinase. O indutor biótico não proporcionou aumento significativo (Figura 3 – *B. cereus*), enquanto que o ASM aumentou significativamente a atividade desta enzima após a primeira aplicação para o tratamento com 2 aplicações, embora todos os tratamentos receberam sua primeira aplicação neste momento, sendo que todos apresentaram a mesma tendência. Após a segunda aplicação, somente os tratamentos que receberam 3 e 4 aplicações receberam sua dose, elevando sua atividade a valores diferentes do controle ( $P \leq 0,01$ ). Porém, o tratamento com 2 aplicações que na segunda aplicação recebeu apenas água, voltou a níveis de atividade semelhantes ao controle, evidenciando o mesmo efeito que ocorreu para a quitinase, não estando mais ativo 15 dias após a aplicação da primeira dose. Após a terceira aplicação não houve diferença significativa. Após a quarta aplicação apenas o tratamento que recebeu quatro aplicações elevou-se a ponto de diferir do controle ( $P \leq 0,05$ ), embora, todos os tratamentos com ASM sempre apresentaram tendência a serem mais elevados. (Figura 3 - ASM). De modo geral, as médias de cada um dos tratamentos com ASM, 2, 3 e 4 aplicações, independente da época de coleta (interação indutor x quantidade de aplicação), diferiram do controle (ASM 0), ao nível de  $P \leq 0,05$  (dados não mostrados).



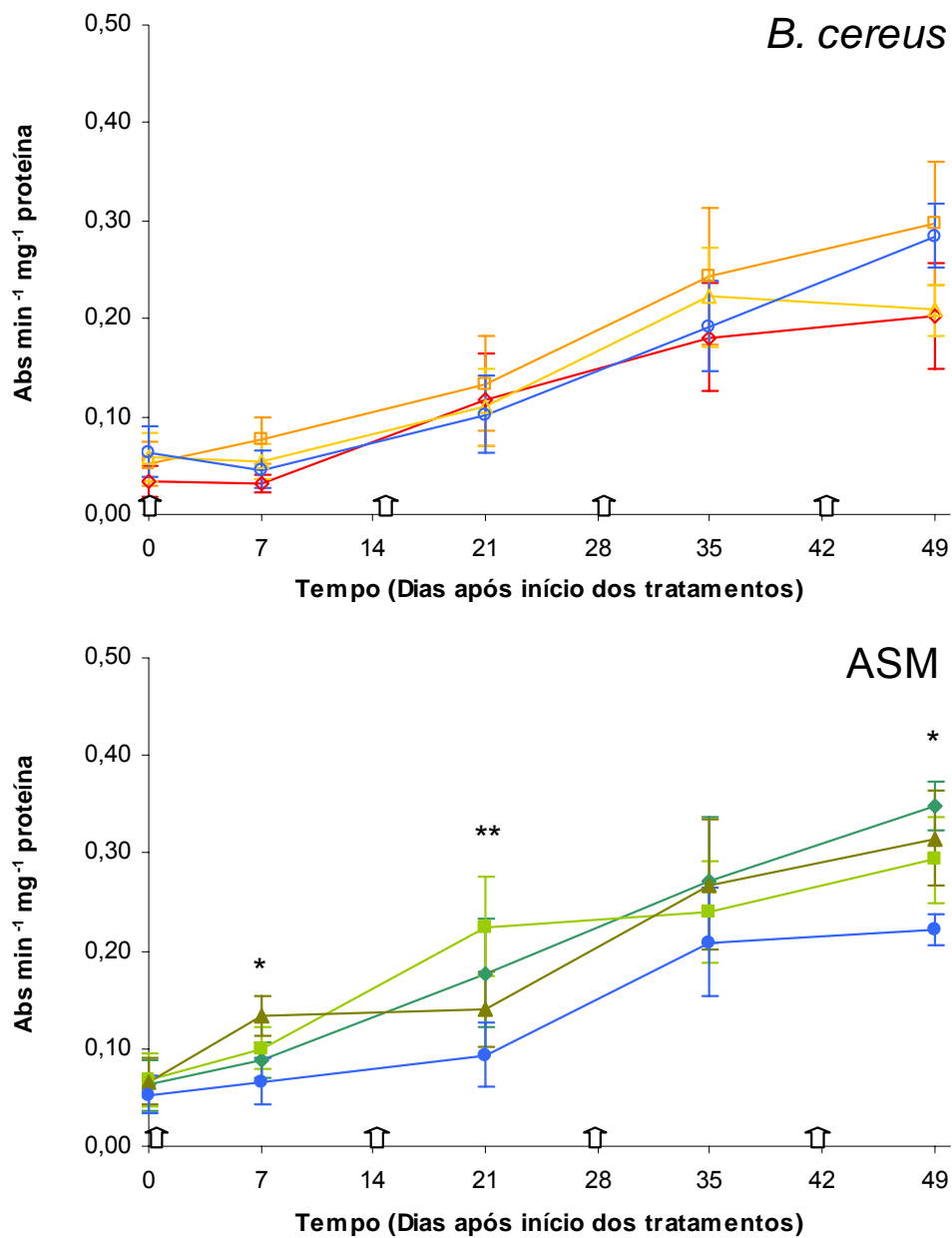


Figura 3 – Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 4 ( $\diamond/\blacklozenge$ ), 3 ( $\square/\blacksquare$ ), 2 ( $\triangle/\blacktriangle$ ) ou nenhuma ( $\circ/\bullet$ ) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \* Indica diferença estatística a 5% e \*\* a 1% pelo teste de Tukey. Valores no gráfico representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005

### 2.3.3.4 Fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase não foi alterada em função dos indutores, bem como em função do número de aplicações ao longo do ciclo da cultura (Figura 4).

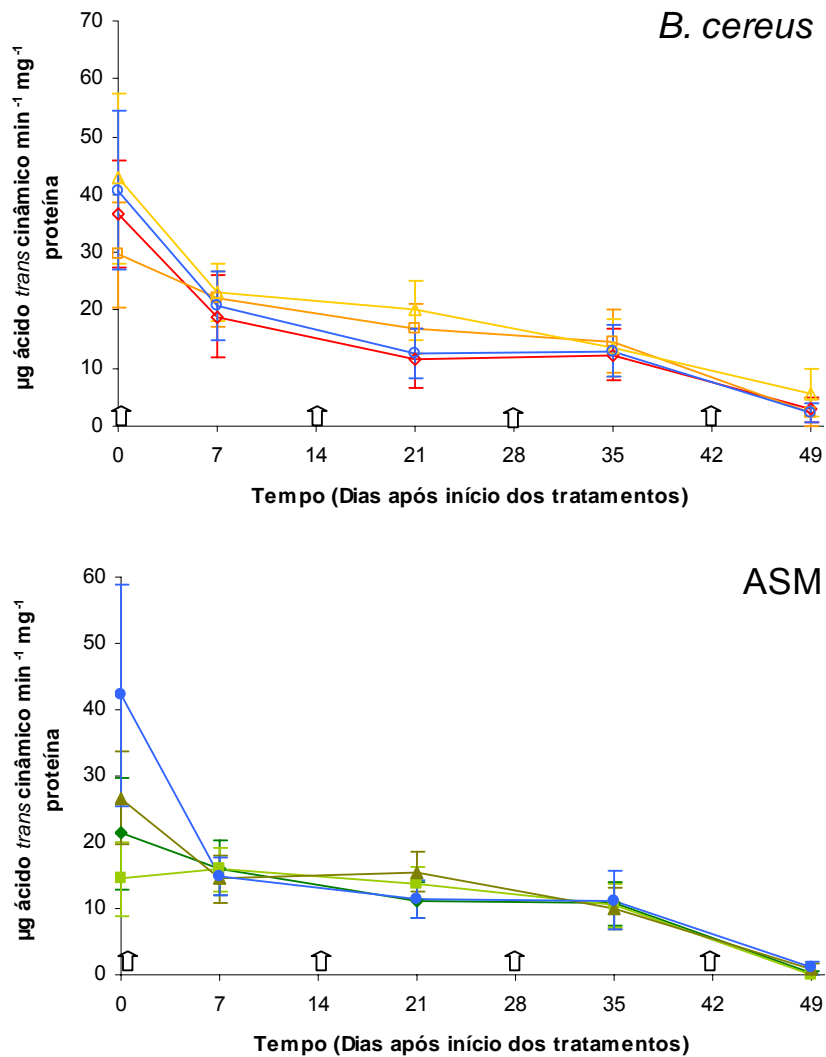


Figura 4 – Atividade de fenilalanina amônia-liase em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \* Indica diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%. Valores do gráfico representam médias de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005

### 2.3.3.5 Polifenoloxidasas

A atividade de polifenoloxidase não foi alterada em função dos indutores, bem como em função do número de aplicações ao longo do ciclo da cultura (Figura 5).

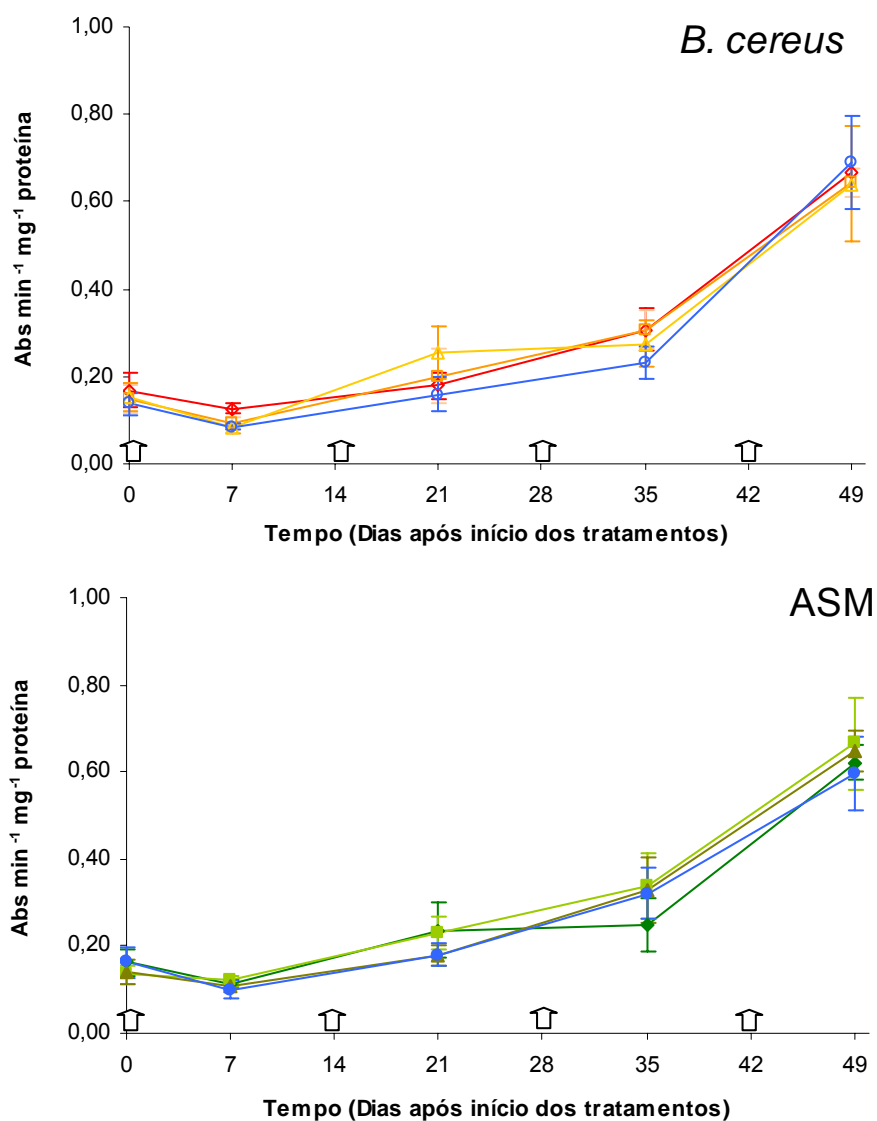


Figura 5 – Atividade de polifenoloxidase em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 4 ( $\diamond/\blacklozenge$ ), 3 ( $\square/\blacksquare$ ), 2 ( $\triangle/\blacktriangle$ ) ou nenhuma ( $\circ/\bullet$ ) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. Valores do gráfico representam médias de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005

#### 2.3.4 Atividade de protease

A atividade de protease foi avaliada obedecendo ao esquema trifatorial (2 indutores x 4 quantidades de aplicação x 5 épocas de coletas ao longo do ciclo da cultura), e o comportamento dessa variável foi analisado a partir do desdobramento da interação tripla que pode ser visualizada na Figura 6. Para o indutor biótico não houve nenhuma diferença significativa para as quantidades de aplicações em nenhuma época de coleta. Porém, para o indutor abiótico houve aumento significativo, para os tratamentos que receberam 3 e 4 aplicações na terceira época de coleta, efetuada após a segunda aplicação. No desdobramento da interação entre os fatores “quantidade de aplicação” e “indutor” observa-se o efeito do aumento da atividade de protease para o tratamento que recebeu 4 aplicações de ASM, havendo nítida tendência para os tratamentos que receberam 2 e 3 aplicações de ASM e 3 e 4 aplicações de *B. cereus* (Figura 7).

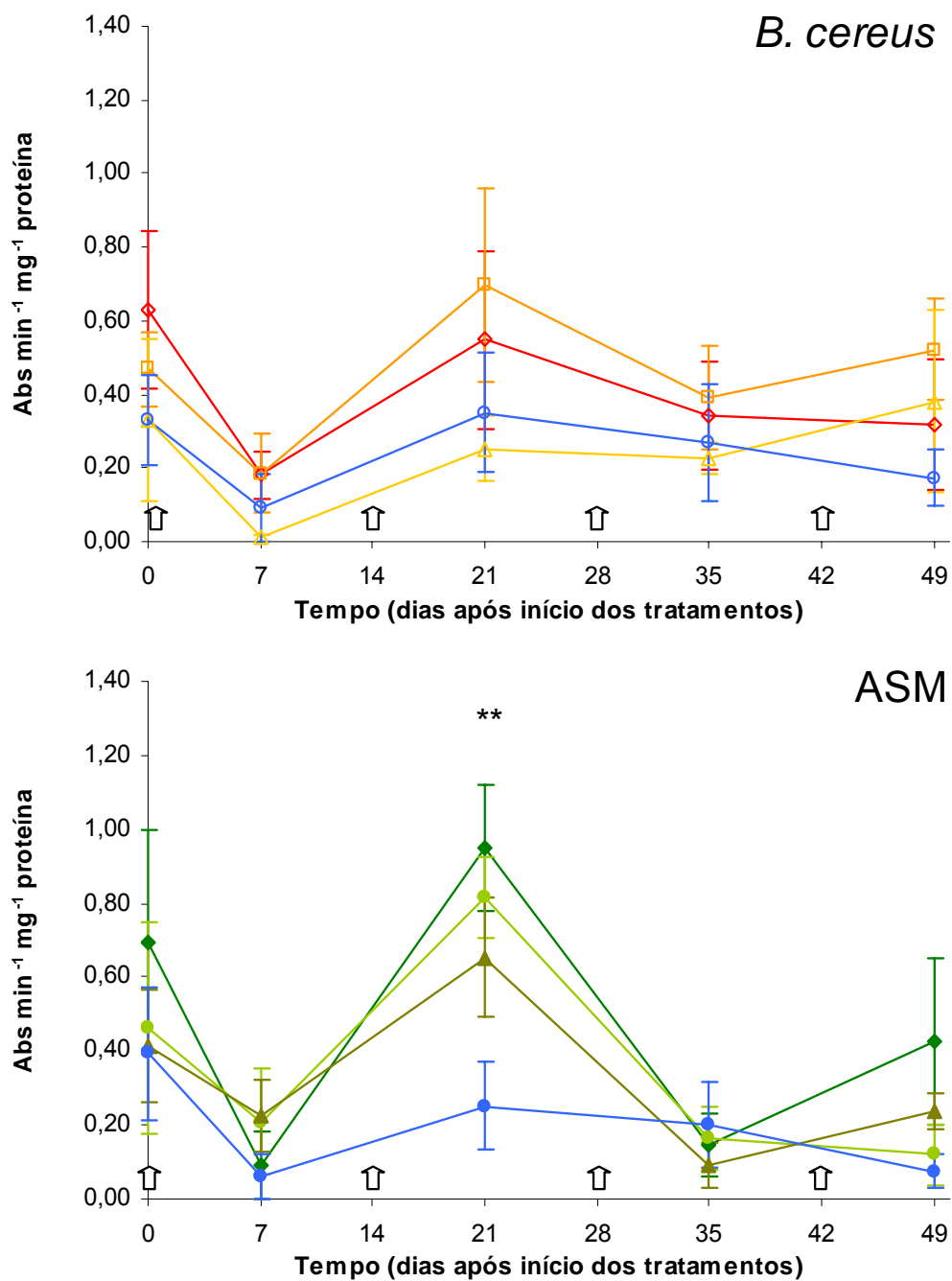


Figura 6 – Atividade de protease em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 4 ( $\diamond/\blacklozenge$ ), 3 ( $\square/\blacksquare$ ), 2 ( $\triangle/\blacktriangle$ ) ou nenhuma ( $\circ/\bullet$ ) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão

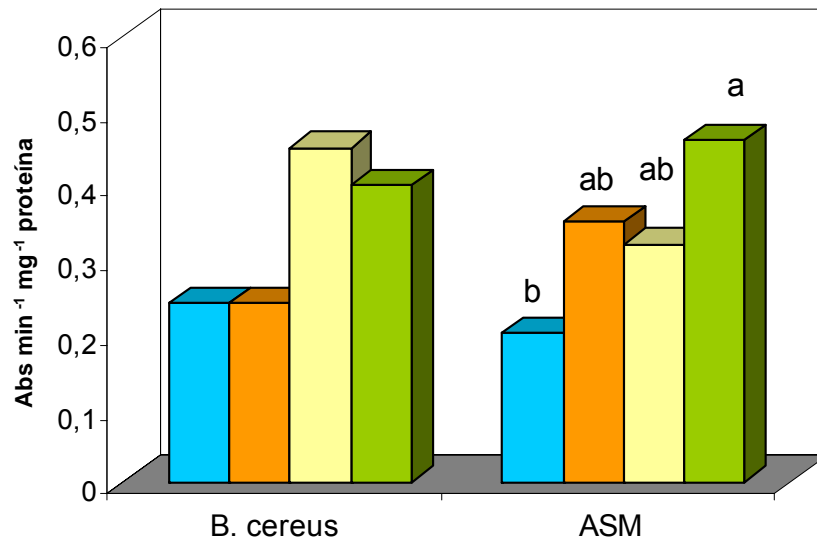


Figura 7 - Atividade de protease em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 2 (■), 3 (■) ou 4 (■) vezes ao longo do ciclo da cultura, comparado com plantas pulverizadas apenas com água (■). Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 1%

### 2.3.5 Aspectos fisiológicos

#### 2.3.5.1 Fotossíntese

A fotossíntese não sofreu alteração com a utilização dos dois indutores, avaliada diariamente após a sua aplicação (Figura 8). Porém, ao longo do ciclo da cultura, cuja avaliação, seguiu ao esquema trifatorial (2 indutores x 4 quantidades de aplicação x 8 épocas de coleta de dados ao longo do ciclo da cultura), o comportamento dessa variável foi analisado a partir do desdobramento da interação tripla (Figura 9). Observou-se tendência a redução da atividade fotossintética pela aplicação de ASM, embora não tenha mostrado diferença significativa em nenhuma das épocas de coleta (Figura 8 – ASM). Enquanto que *B. cereus* não mostrou nenhuma tendência. No desdobramento da interação entre as variáveis “indutor” x “número de aplicação”, 2, 3 e 4 aplicações de ASM causaram redução na fotossíntese, enquanto que esse mesmo desdobramento para o indutor *B. cereus* não mostrou diferença significativa (Figura 10).

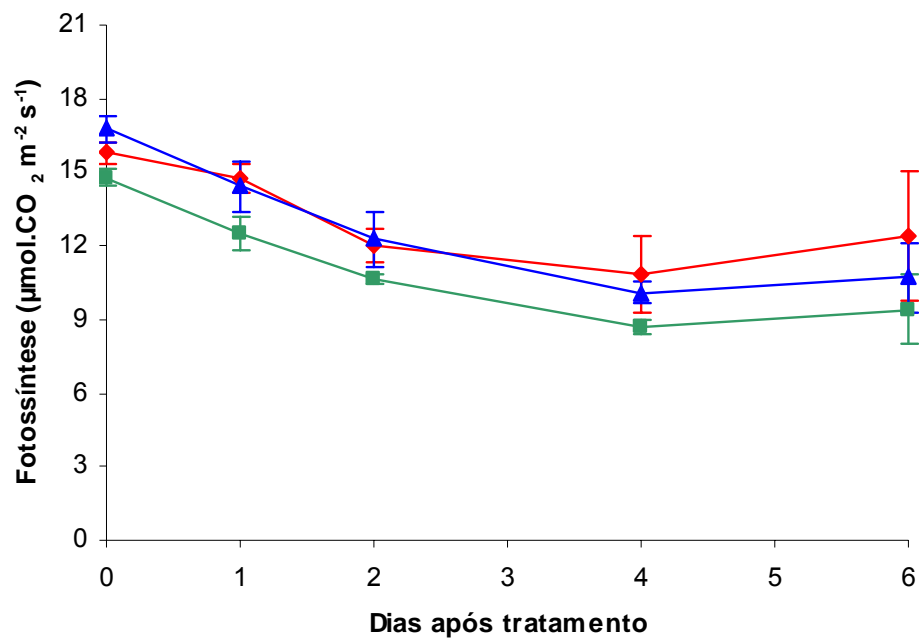


Figura 8 – Fotossíntese em feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* na concentração de  $10^8$  ufc (◆) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) na concentração de 50 mg i.a.  $\text{L}^{-1}$  (■) comparados com plantas tratadas apenas com água destilada (▲). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão

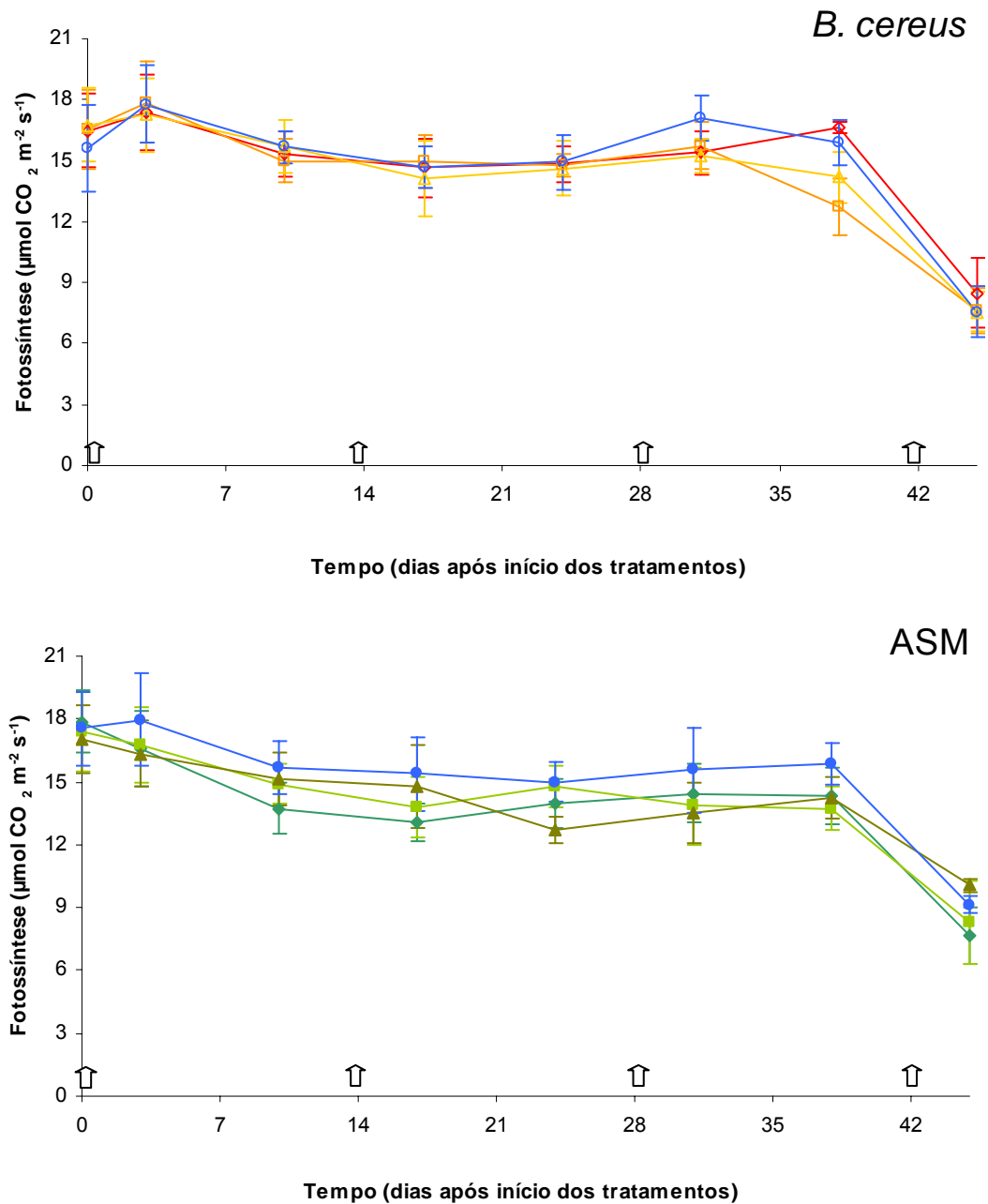


Figura 9 – Fotossíntese em feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \* Indica diferença estatística a 5% e \*\* a 1% pelo teste de Tukey. Valores no gráfico representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005



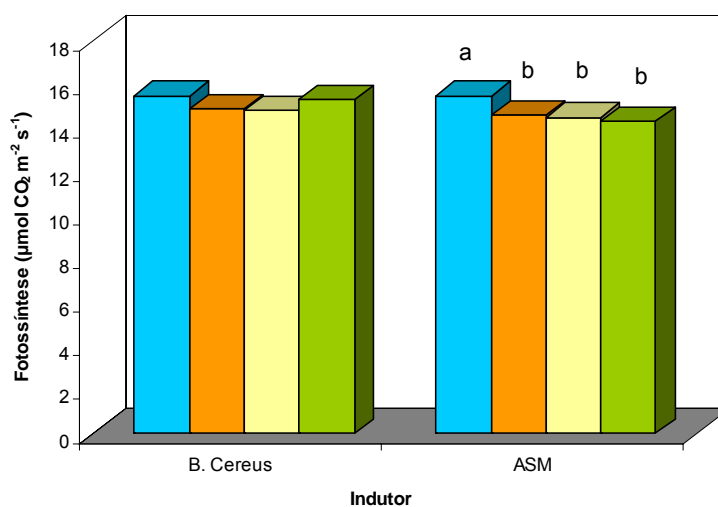


Figura 10 - Fotossíntese em feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 2 (■), 3 (■) ou 4 (■) vezes ao longo do ciclo da cultura, comparado com plantas pulverizadas apenas com água (■). Valores representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 1%

### 2.3.5.2 Respiração

A respiração avaliada diariamente após a aplicação dos indutores foi aumentada em função dos indutores. Na Figura 11 pode-se verificar a elevação da respiração para os dois indutores, no entanto apenas o indutor biótico (*B. cereus*) apresentou aumento significativo até quatro dias após a aplicação, não se constatando diferença no sexto dia, e tendendo a voltar a normalidade. Já ao longo do ciclo da cultura, cuja avaliação, obedeceu ao esquema trifatorial (2 indutores x 4 quantidades de aplicação x 8 épocas de coleta de dados ao longo do ciclo da cultura), e o comportamento dessa variável analisado a partir do desdobramento da interação tripla (Figura 12), a respiração comportou-se de maneira diferenciada para os dois indutores, sendo que o indutor biótico não alterou significativamente a respiração em nenhuma das épocas de coleta de dados para os quatro níveis da variável número de aplicação, porém, após as duas primeiras aplicações nota-se uma tendência a ser mais elevada, para todos os tratamentos independente do número de aplicações (Figura 12 - *B. cereus*). O ASM manteve a respiração mais elevada em todo o ciclo da cultura diferindo

estatisticamente ( $P \leq 0,01$ ) em pelo menos duas épocas de avaliação (24 e 31 dias após o início dos tratamentos) diferenciando-se do controle na coleta de dados aos 24 dias o tratamento com 3 aplicações e na coleta aos 31 dias diferiu os tratamentos com 2 e 4 aplicações (Figura 12 - ASM), e, no desdobramento da interação “indutor” x “número de aplicações”, 2, 3 ou 4 aplicações de ASM, diferiram ( $P \leq 0,01$ ) em relação ao controle (água), embora entre as três quantidades de aplicação de ASM não houve diferenças (Figura 13).

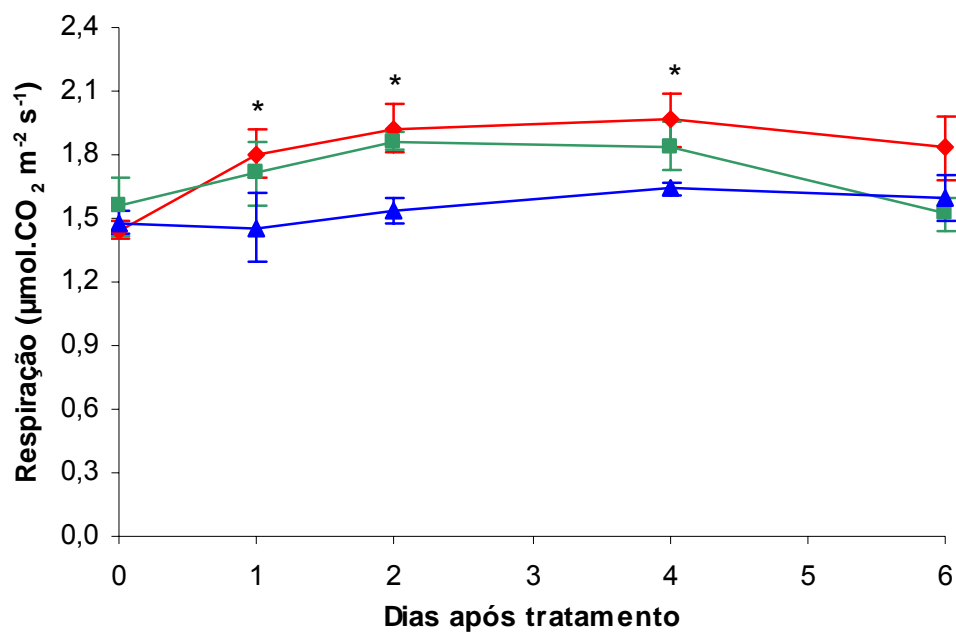


Figura 11 – Respiração em feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* na concentração de  $10^8$  ufc (♦) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) na concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$  (■), comparados com plantas tratadas apenas com água destilada (▲). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \* Indica diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey

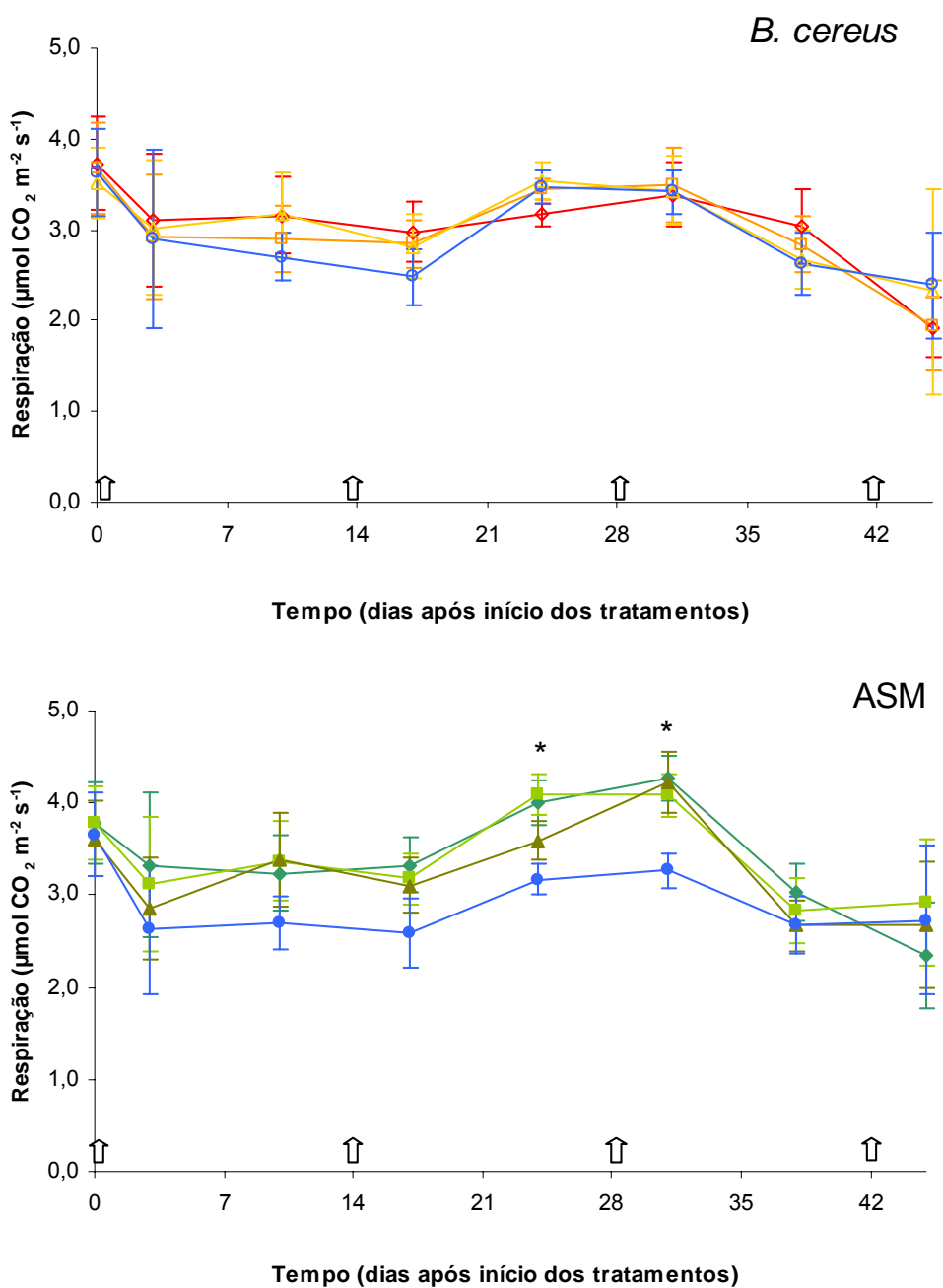


Figura 12 – Respiração em feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média ± o erro padrão. \* Indica diferença estatística a 5% e \*\* a 1% pelo teste de Tukey. Valores no gráfico representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005

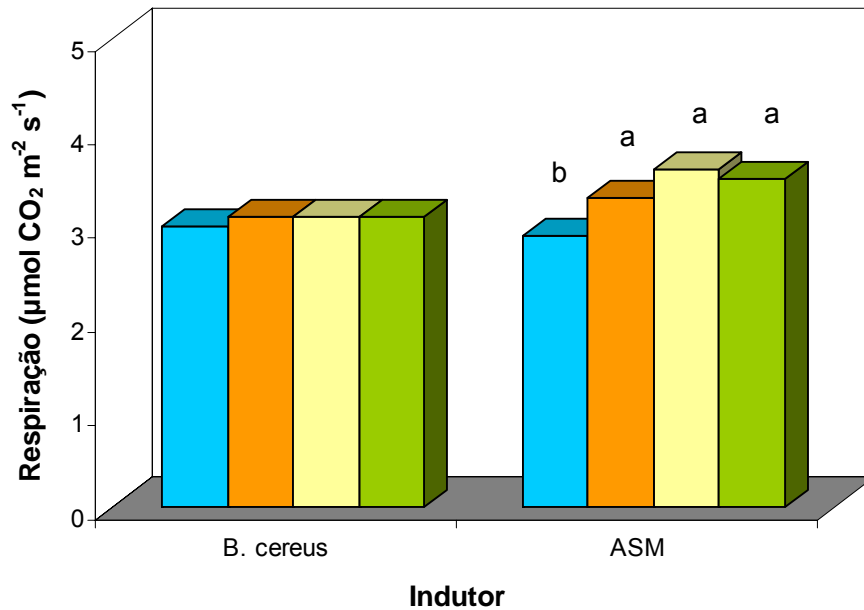


Figura 13 – Respiração em feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>) aplicados 2 (■), 3 (■) ou 4 (■) vezes ao longo do ciclo da cultura, comparado com plantas pulverizadas apenas com água (■). Valores representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 1%

### 2.3.6 Síntese de compostos de defesa celular

O teor de compostos fenólicos e a síntese de lignina foram avaliados obedecendo ao esquema trifatorial com 2 indutores x 4 quantidades de aplicação x 5 épocas de coleta ao longo do ciclo da cultura.

#### 2.3.6.1 Fenóis totais

O teor de compostos fenólicos totais ao longo do ciclo da cultura para cada quantidade de aplicação pode ser visualizado na Figura 14, onde se observa que esta variável foi alterada em função dos indutores. A aplicação de *B. cereus* exibiu uma tendência na redução do teor de fenóis totais após a segunda aplicação, no entanto, sem causar diferença estatística. O ASM apresentou a mesma tendência, porém alcançando diferença significativa após a segunda aplicação para as quantidades de 3 e 4 aplicações que já haviam recebido cada um a sua segunda dose. Por sua vez, o

tratamento com 2 aplicações havia recebido apenas uma dose na primeira época de aplicação, embora tenha exibido uma tendência em reduzir o teor de fenóis, a mesma não foi significativa. Essa tendência em apresentar menor concentração de fenóis permaneceu até o fim do ciclo.

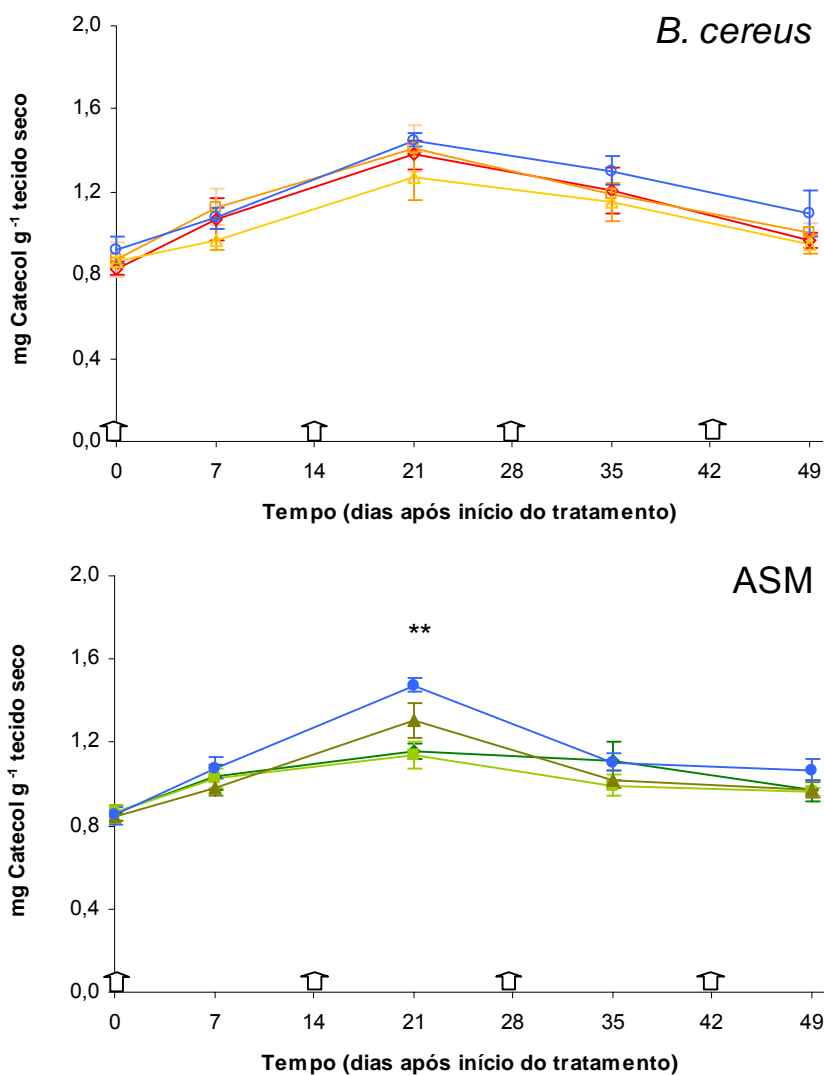


Figura 14 – Teor de compostos fenólicos no tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \*\* Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

### 2.3.6.2 Lignina

A síntese de lignina a partir do desdobramento da interação tripla pode ser visualizada na Figura 15. O indutor biótico não induziu a formação de lignina nos tecidos, não sendo possível detectar diferença estatística, e nem mesmo alguma tendência (Figura 15-B. *cereus*). Já para o indutor ASM, os resultados de todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle (água) na última coleta, após a quarta aplicação (Figura 15-ASM).

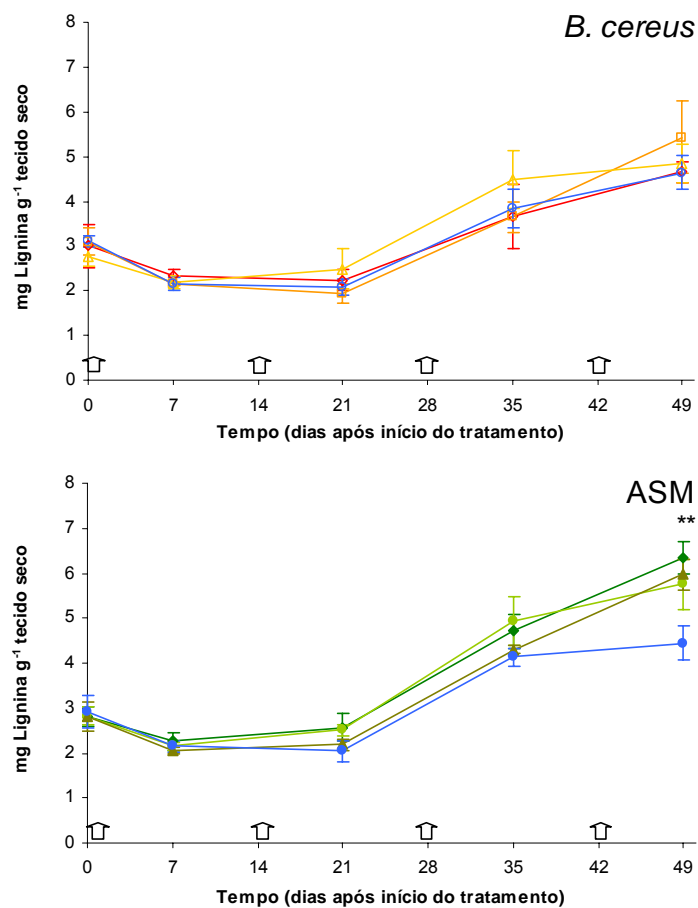


Figura 15 – Teor de lignina do tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \*\* Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

### **2.3.7 Teor de compostos do metabolismo primário no tecido foliar**

O conteúdo de proteínas solúveis, bem como de açúcares redutores no tecido foliar, foram avaliados obedecendo ao esquema trifatorial (2 indutores x 4 quantidades de aplicação x 5 épocas de coleta ao longo do ciclo da cultura)

#### **2.3.7.1 Proteína**

O comportamento dessa variável, a partir do desdobramento da interação tripla, pode ser visualizada na Figura 16. Houve redução significativa do teor de proteína solúvel, para o tratamento com quatro aplicações na quarta coleta para o indutor *B. cereus*, enquanto que para o indutor ASM não houve diferença em nenhuma das épocas de coleta, embora se possa notar uma tendência contrária ao efeito do indutor biótico, com um aparente aumento na concentração de proteínas. No desdobramento da interação entre “quantidades de aplicação” x “Indutor” observa-se o efeito do indutor *B. cereus* na redução do teor de proteínas solúveis, enquanto que com ASM isso não acontece (Figura 17).

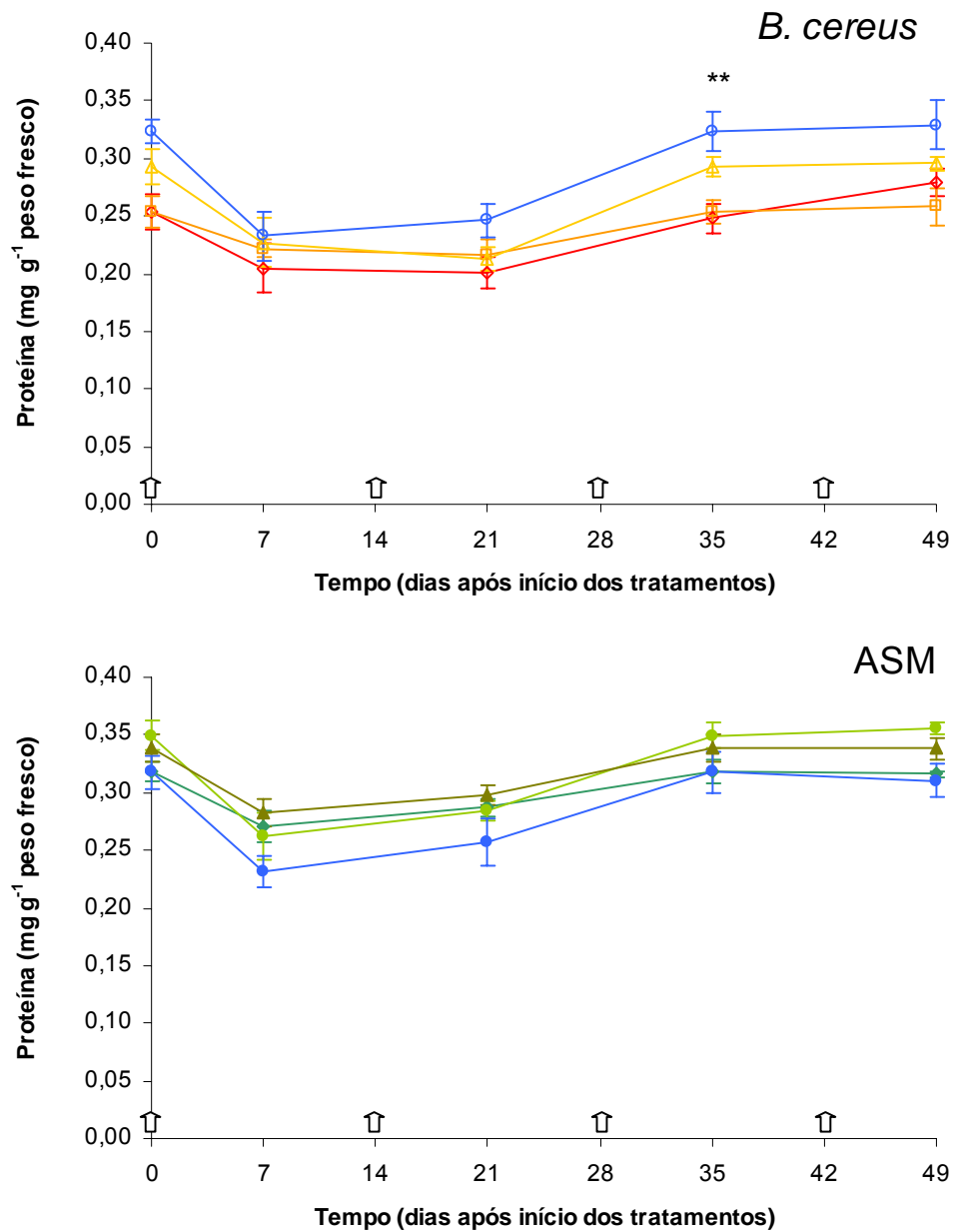


Figura 16 – Teor de proteínas solúveis do tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \*\* Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey. Valores no gráfico representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005



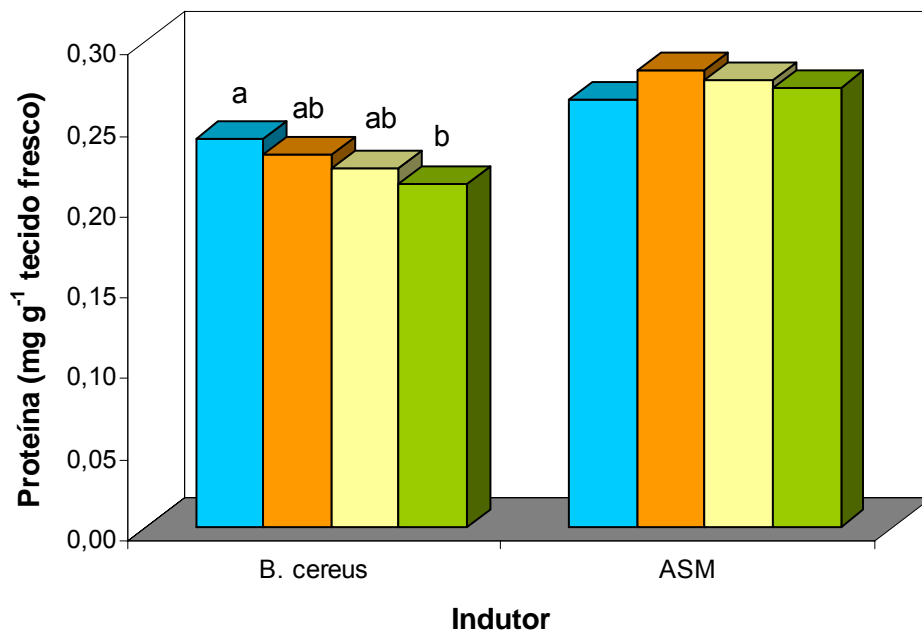


Figura 17 – Teor de proteínas solúveis do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 2 (■), 3 (■) ou 4 (■) vezes ao longo do ciclo da cultura, comparado com plantas pulverizadas apenas com água (■). Valores representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 1%

### 2.3.7.2 Açúcares redutores

Os açúcares redutores avaliados a partir do desdobramento da interação tripla não mostraram grandes alterações no tecido foliar para os dois indutores, não sendo observada diferença estatísticas (Figura 18). Porém, uma pequena tendência em aumento pode ser notada com o indutor ASM, para todos os tratamentos que receberam o indutor a partir da primeira aplicação.

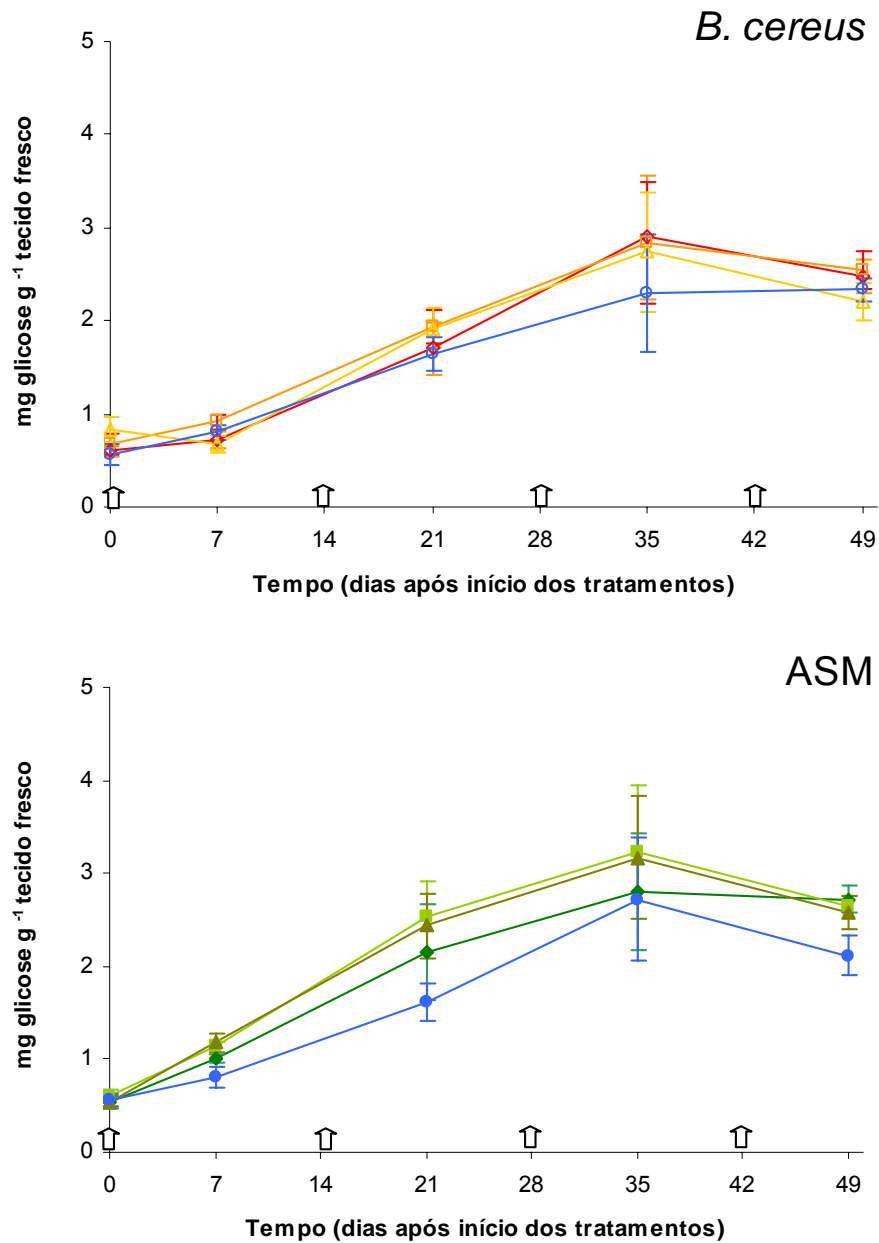


Figura 18 – Teor de açúcares redutores em tecido foliar do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de  $50 \text{ mg i.a. L}^{-1}$ ) aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações (2 aplicações – 0 e 28; 3 aplicações – 0, 14 e 28 e 4 aplicações – 0, 14, 28 e 42 dias após o início). Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. Valores no gráfico representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005

## **2.3.8 Produção**

### **2.3.8.1 Massa seca das plantas**

O acúmulo de massa seca por parte da planta também foi avaliado obedecendo ao esquema trifatorial (2 indutores x 4 quantidades de aplicação x 5 épocas de coleta ao longo do ciclo da cultura), e o comportamento dessa variável, a partir do desdobramento da interação tripla, pode ser visualizada na Figura 19. O acúmulo de massa seca ao longo do seu ciclo não foi afetado pela presença do indutor biótico, não mostrando diferença estatística (Figura 19 - *B. cereus*). No entanto, os tratamentos que receberam 3 e 4 aplicações de ASM diferiram estatisticamente após a terceira aplicação ( $P \leq 0,01$ ). Após a quarta aplicação, o tratamento com 4 aplicações de ASM reduziu a massa seca a ponto de se diferenciar ( $P \leq 0,01$ ) não apenas do controle, mas também dos outros tratamentos (2 e 3 aplicações), enquanto que o tratamento com 2 aplicações de ASM não foi afetado o suficiente para se diferenciar do controle, porém, notando-se uma nítida tendência a redução (Figura 19 - ASM).

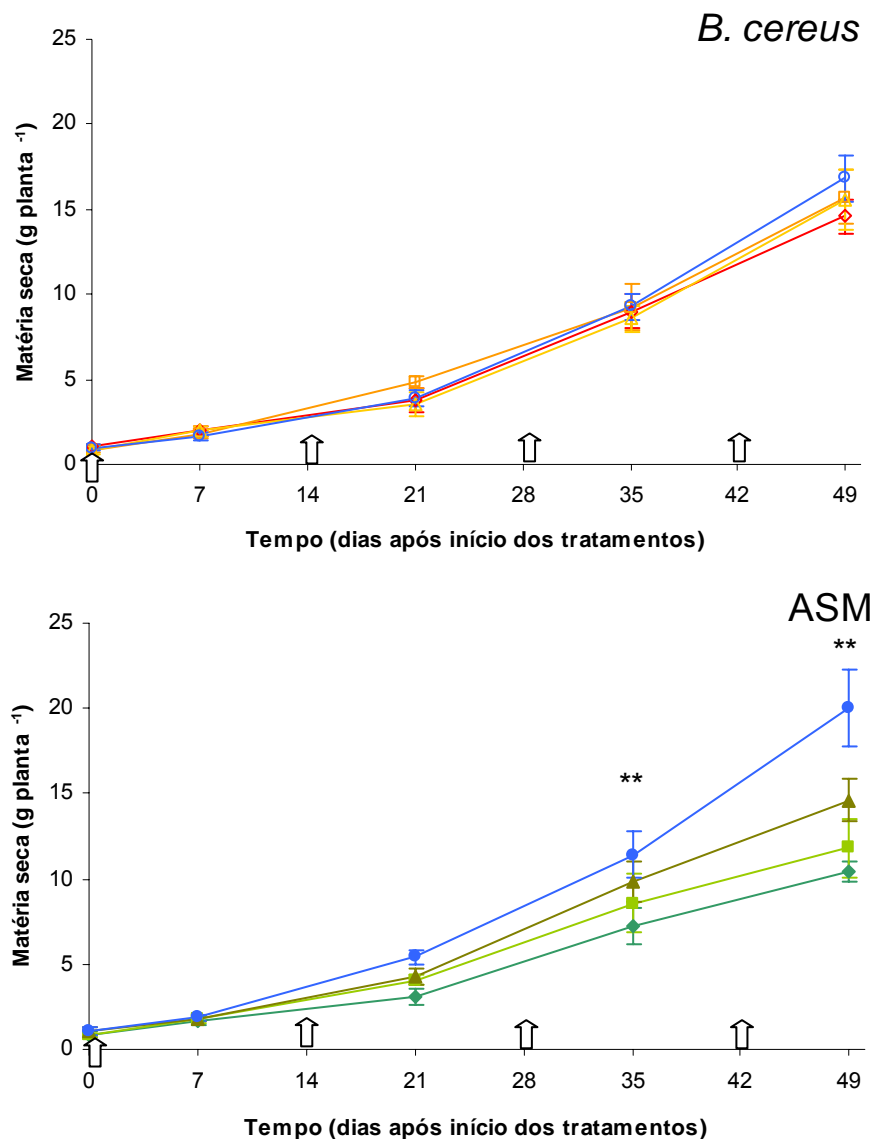


Figura 19 – Matéria seca de parte aérea do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ), aplicados 4 (◇/◆), 3 (□/■), 2 (△/▲) ou nenhuma (○/●) vez ao longo do ciclo da cultura. Setas indicam o momento das aplicações. Barras indicam a média  $\pm$  o erro padrão. \*\* Indica diferença estatística a 1% pelo teste de Tukey

### 2.3.8.2 Produtividade e parâmetros de produção

A produtividade foi avaliada pelo desdobramento do fatorial duplo (2 indutores x 4 quantidades de aplicação). Além da redução da massa seca (Figura 19) houve redução da produtividade, causada pelo indutor ASM. Na Figura 20 pode-se observar

que não houve diferença significativa para o tratamento com 2 aplicações de ASM, mas observa-se uma nítida tendência a redução, já para 3 e 4 aplicações houve diferença significativa ( $P \leq 0,01$ ). Essa redução na produtividade ocorreu principalmente pela redução do número de grãos (Figura 21 – B), uma vez que, o tamanho do grão não sofreu alteração, o que é refletido na variável peso de 100 sementes (Figura 21 – D), a qual não apresentou diferença significativa. A variável números de grãos por vagem também foi afetada, sofrendo redução pela aplicação de ASM (Figura 21 – C), no entanto, a variável número de vagens não foi afetada pela aplicação de ASM (Figura 21 – A). Já o indutor biótico não afetou a produtividade das plantas, o que é demonstrado na Figura 20, bem como nenhuma das variáveis relacionada aos parâmetros de produção foram alteradas significativamente (Figura 21).

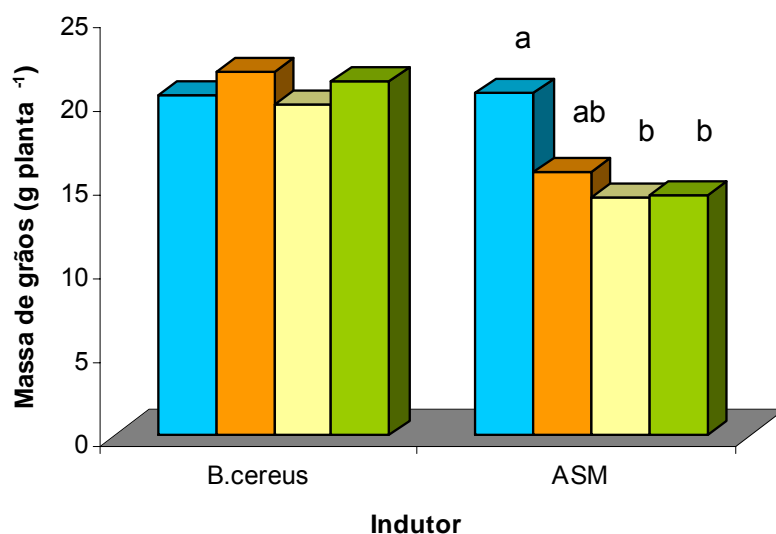


Figura 20 – Produtividade do feijoeiro em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>) aplicados 2 (■), 3 (■) ou 4 (■) vezes ao longo do ciclo da cultura, comparado com plantas pulverizadas apenas com água (■). Valores representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%. Coeficiente de variação 22,23%

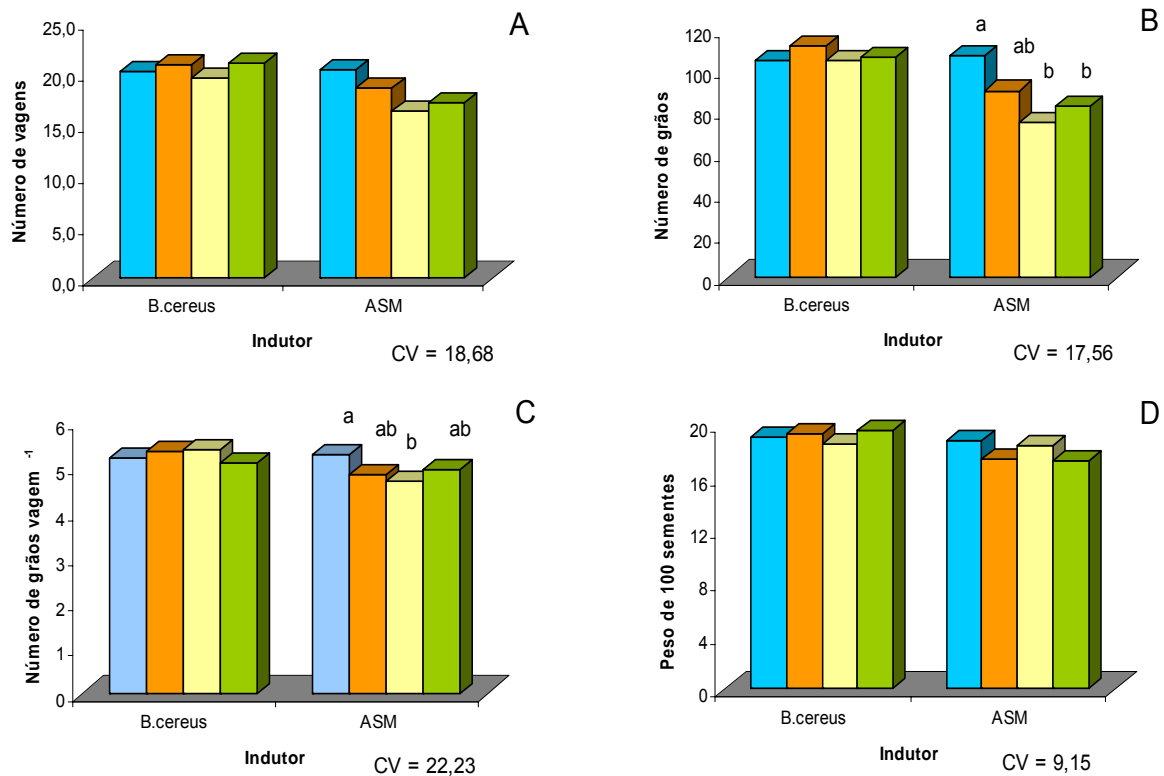


Figura 21 – Número de vagens por planta (A), número de grãos por planta (B), número de grãos por vagem (C) e peso de 100 sementes (D) do feijoeiro, em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a.  $L^{-1}$ ) aplicados 2 (■), 3 (■) ou 4 (■) vezes ao longo do ciclo da cultura, comparado com plantas pulverizadas apenas com água (■). Valores representam média de dois experimentos conduzidos em 2004 e 2005. Letras distintas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5%

### 2.3.9 Qualidade

Do ponto de vista da qualidade do grão, avaliou-se o teor de amido e o teor de proteína a partir do desdobramento da variável “indutor” dentro da variável “número de aplicações”, onde nota-se a ocorrência do aumento do teor de proteínas em função do aumento do número de aplicações de ASM em relação ao aumento do número de aplicações de *B. cereus* (Figura 22 – A), e, o efeito contrário para o teor de amido, mostrando aumento pela aplicação de *B. cereus* em relação a aplicação de ASM (Figura 22 – B). Porém, não se constatou diferença dos efeitos das quantidades de

aplicação em relação às plantas que não receberam os indutores (zero). As variáveis teor de fibras (Figura 22 – C), teor de lipídios (Figura 22 – D) e cinzas (dados não mostrados) não sofreram alterações em função do tratamento com os indutores.

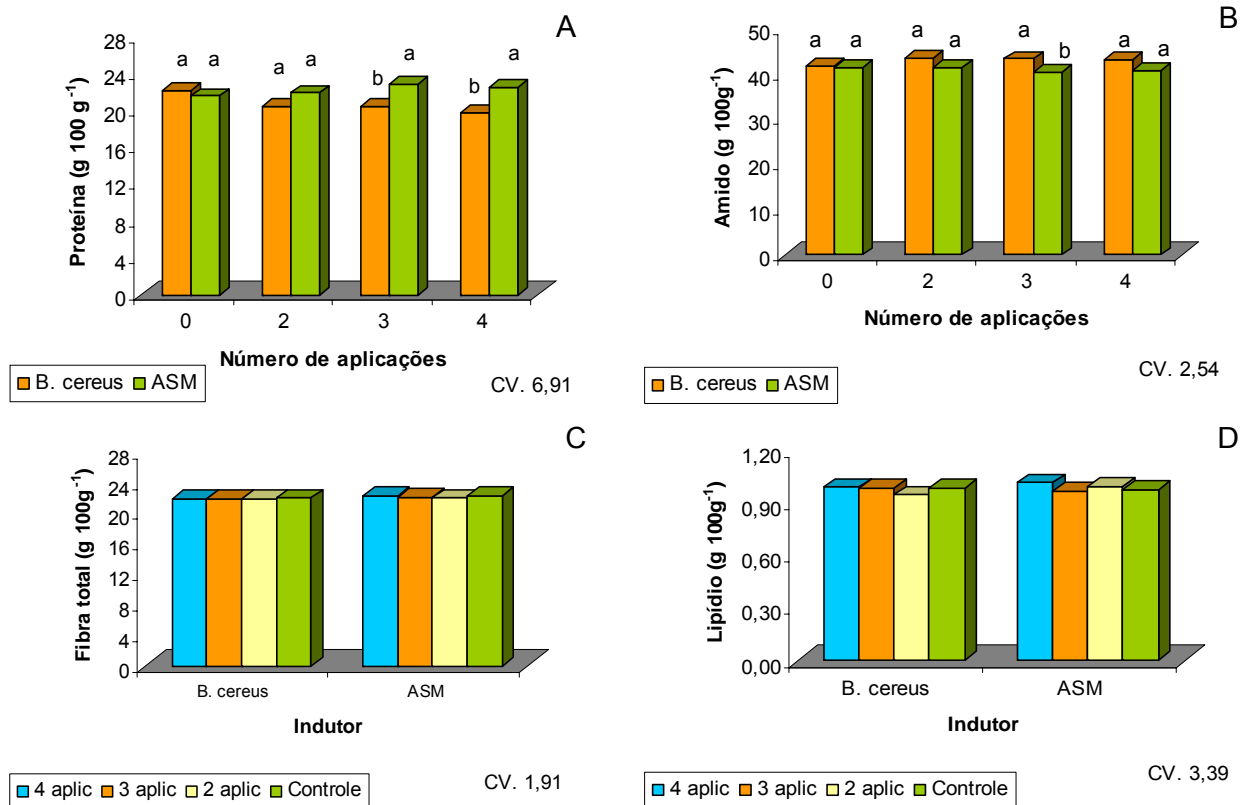


Figura 22 – Teor de proteínas (A), amido (B), fibras (C) e lipídios (D) das sementes de feijão em função do tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus* (concentração de  $10^8$  ufc) ou com solução de acibenzolar-S-metil (ASM) (concentração de 50 mg i.a. L<sup>-1</sup>) aplicados 4, 3, 2 ou nenhuma vez ao longo do ciclo da cultura. Letras distintas indicam diferença estatística a 5% pelo teste de Tukey

## 2.4 Discussão

A exceção das avaliações de severidade (itens 2.3.1 e 2.3.2), todos os dados analisados consistem em efeitos dos indutores (*B. cereus* e ASM) na ausência do patógeno, uma vez que, o objetivo deste trabalho foi avaliar o custo adaptativo da resistência induzida até o momento da chegada deste. Como as plantas apresentam

mecanismos de resistência latentes, com o objetivo de poupar energia para a reprodução, aproveitando o atraso temporal até a eventual chegada do patógeno (BOSTOCK, 2005; HEIL, 2002), o custo de maior importância está nesse período, visto que, o custo para proteger a planta, quando um patógeno ataca as mesmas, deve valer a pena, e, as plantas induzidas serem beneficiadas (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985). Se energia é alocada para proteção, onde não há condições para a ocorrência da doença, o investimento pode não valer a pena e o custo ser muito maior do que simplesmente o valor de aplicação de um indutor.

#### **2.4.1 Avaliação da severidade do crestamento bacteriano**

O crestamento bacteriano foi reduzido a partir da indução de resistência com os indutores ASM e *B. cereus*, porém o efeito do ASM foi superior ao *B. cereus*, reduzindo a doença em torno de 79,1%. Nenhum trabalho com ASM no patossistema feijoeiro/*X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi encontrado, porém a eficiência do ASM tem sido verificada em feijoeiro em outras interações, como mostrado por Birigimana e Höfte (2002), onde a redução da severidade da antracnose causada por *C. lindemuthianum* foi reduzida em 47%. Iriti e Faoro (2003a) reduziram em até 100% os sintomas de ferrugem causada por *U. appendiculatus*. Porém, no patossistema feijoeiro/*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Soares e Maringoni (2002) não verificaram proteção tanto no tratamento de sementes, quanto com aplicação foliar de ASM.

O efeito do indutor *B. cereus* foi inferior ao ASM, ocasionando 36,8% de proteção. A ação do indutor biótico foi através da indução de resistência, visto que, sua aplicação foi efetuada sobre o primeiro par de folhas, e o desafio com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi sobre o primeiro trifólio, portanto, em locais diferentes na planta. Com rizobactérias tem sido verificada a ocorrência da resistência induzida em feijoeiro, a partir do tratamento de sementes com *Pseudomonas putida* (isolado BTP1) e *P. aeruginosa* (isolado KMPCH) contra *Botrytis cinerea*, onde Ongena et al. (2002) observaram redução na doença, em torno de 42 e 35%, respectivamente. Bigirimana e Höfte (2002) observaram que diferentes rizobactérias induziram resistência contra *C. lindemuthianum*, reduzindo os sintomas em até 30%. Silva et al. (2003) observaram em



tomateiro induzido por *B. cereus*, isolado de solo rizosférico, aumento da resistência a patógenos como *Alternaria solani* (66%), *Corynespora cassiicola* (37%), *Oidium lycopersici* (66%), *Stemphylium solani* (56%) e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (35%).

#### 2.4.2 Avaliação da severidade do mofo branco no campo

A proposta inicial deste trabalho foi de se avaliar no campo as doenças eventuais que pudessem aparecer. Para tanto, a condição para favorecimento da ocorrência foi utilizar alta densidade de plantio, no caso, aproximadamente 20 plantas por metro linear e irrigação por aspersão, mantendo-se o solo sempre úmido, em todo o período vegetativo, reduzindo-se no início do florescimento, para se evitar acamamento. A única doença que se manifestou no campo foi o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrando-se bastante agressiva principalmente devido a condição ambiental favorável, alta umidade e temperaturas amenas, uma vez que, o plantio foi efetuado no mês de março de 2006. A ocorrência da doença também estava associada a presença de inóculo na área, cujo histórico mostrava ocorrência generalizada.

A severidade do mofo branco foi alta devido às condições ambientais favoráveis e o alto potencial de inóculo inicial que também contribuiu para a severidade. Como a presença do inóculo não estava sob controle, possivelmente estava distribuído desuniformemente na área, isto fez com que ocorresse elevado coeficiente de variação (37,1% - dados transformados por  $\sqrt{X + 0,5}$ ) e assim não se puderam observar diferenças estatísticas. No entanto, nos tratamentos observou-se uma tendência na redução da doença com o aumento do número de aplicações para o indutor ASM, sendo que, com 2 aplicações na média do tratamento, a severidade foi 19% menor, com 3 aplicações, a média foi 27% menor e com 4 aplicações 43,8% menor em relação ao tratamento que recebeu apenas água destilada. O indutor *B. cereus* com 2 aplicações reduziu o valor da severidade em 15,8% e com 3 aplicações em 50,5%, no entanto, com 4 aplicações esse alto efeito redutor não existiu, sendo que o valor da severidade foi reduzido em apenas 10,5%. Esse efeito pode estar relacionado a desuniformidade da distribuição dos escleródios na área, mascarando o efeito real. Dann et al. (1998) verificaram a indução de resistência com ASM em quatro cultivares

de soja contra *S. sclerotiorum*, agente causal de mofo branco, e o efeito médio nos cultivares foi uma redução de 44,3% na severidade, sendo esse valor significativo, porém, o inóculo foi incorporado ao solo de forma e quantidade semelhantes para todos os tratamentos. Mesmo assim, nota-se no trabalho de Dann et al. (1998), que o coeficiente de variação também foi alto, pois embora o mesmo não tenha sido mostrado, a diferença mínima significativa foi bastante alta, o que pode ser um efeito comum em interações com este patógeno.

### **2.4.3 Atividade de enzimas relacionadas a indução de resistência**

A atividade de peroxidase foi aumentada pelos dois indutores nas plantas de feijão, e quanto maior o número de aplicações, maior a atividade a medida que vai se chegando ao fim do ciclo da cultura. Porém, a atividade foi sempre menor com o indutor biótico do que com o ASM. As atividades de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase mostraram-se muito semelhantes, sendo que a atividade destas duas enzimas para o indutor ASM aumentava quando recebiam aplicação, porém, decorridos 14 dias o nível de atividade retornava a valores próximo ao controle. Porém, quando as plantas recebiam nova aplicação a atividade voltava a aumentar. Isso pode ser observado no tratamento com 2 aplicações, cujo intervalo entre aplicações foi de 28 dias, tempo suficiente para que estes mecanismos não estivessem mais ativos. Já nos tratamentos com 3 e 4 aplicações, o intervalo entre aplicações foi de 14 dias, fazendo com que os mecanismos permanecessem ativos no período de tempo em que estavam sendo efetuadas as aplicações. Já o indutor *B. cereus* não mostrou ativação de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase.

Outros pesquisadores observaram a atividade destas enzimas sempre que as plantas expressavam a resistência induzida. Nandakumar et al. (2001) induziram resistência em arroz com *Pseudomonas fluorescens*, uma rizobactéria promotora de crescimento, e verificaram a redução da severidade da podridão da bainha causada por *Rhizoctonia solani*, correlacionada com o aumento na atividade de peroxidase e quitinase de forma bastante atenuada. Porém, a partir do momento em que as plantas foram desafiadas com o patógeno, a magnitude dessa atividade foi aumentada, o que não aconteceu em plantas que não foram induzidas, mas desafiadas com o patógeno, característica comum de plantas pré-condicionadas. Portanto no presente trabalho, isso

pode indicar que a expressão mais atenuada da peroxidase e a não observação de diferenças significativas nas atividades para quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase com *B. cereus* não seja rejeitável como mecanismo envolvido na resistência, pois o objetivo foi de se verificar os custos antes da chegada do patógeno. Estes mecanismos podem ser acionados apresentando maior expressão a partir do desafio com algum patógeno, e assim, mostrar que a planta pode estar pré-condicionada. Já em tomateiro, Silva et al. (2003) constataram que *B. cereus* causou uma super expressão da peroxidase, aumentando em 10 vezes a atividade da mesma, mostrando que dependendo da interação, o resultado pode ser bastante variável. Já com ASM, Buzi et al. (2004), trabalhando com melão, observaram aumentos na atividade da peroxidase e quitinase correlacionados com aumento na resistência a *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Bokshi; Morris e Deverall (2003) observaram aumento de  $\beta$ -1,3-glucanase em batata induzida com ASM, correlacionado com aumento da resistência contra *Fusarium semitectum*. Iriti e Faoro (2003a), trabalhando com feijoeiro induzido com ASM, demonstraram redução de 100% na ocorrência de ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus*, e em testes histológicos a presença de alta concentração de  $H_2O_2$ , evidenciando alta atividade de peroxidase nas plantas que expressaram resistência.

A atividade de peroxidase pode produzir radicais livres, tóxicos para o patógeno, em explosões oxidativas (LAMB; DIXON, 1997), participar da síntese de lignina para reforçar a parede celular (IRITI; FAORO, 2003a), bem como produzir moléculas sinalizadoras como o  $H_2O_2$ , que podem levar a expressão de genes relacionados a outros mecanismos de resistência (LAMB; DIXON, 1997; OROZCO-CÁRDENAS; NARVAEZ-VÁSQUES; RYAN, 2001). A quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase apresentam ação direta contra o patógeno degradando a parede celular, com o objetivo de impedir o estabelecimento de relações parasitárias estáveis e a colonização. Neste processo, polímeros de N-acetilglucosamina e  $\beta$ -1,3-glucana, provenientes da parede celular de fungos ou bactérias, podem funcionar como exoelicitores e ativar outros mecanismos de defesa, no entanto, estes mecanismos só são ativados durante a interação patógeno-hospedeiro e, portanto, somente haveria esse custo na presença de algum patógeno. Como o indutor biótico *B. cereus* não ocasionou aumentos na

atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, esse custo não pode ser tributado às plantas tratadas por esse indutor. A rota sinalizadora ativada por rizobactérias geralmente pré-condiciona a planta a responder de forma mais rápida somente com a chegada do patógeno e isso significa manter os mecanismos de defesa latentes e a planta continua a armazenar energia para quando e se houver necessidade, embora a planta esteja capacitada a expressar resistência.

As atividades de fenilalanina amônia-liase (FAL) e polifenoloxidase (PFO) não mostraram alterações em função dos indutores na análise quantitativa, o que poderia significar que toda a rota dos fenilpropanóides não sofreu alteração, ou seja, mecanismos como síntese de lignina, compostos fenólicos, quinonas, etc. podem não ser potencializados em função dos indutores. Uma substancial porção de carbono fixado é canalizado pela FAL para a rota dos fenilpropanóides, visto que o ácido *trans*-cinâmico é precursor de uma ampla gama de compostos como flavonóides, cumarinas, ligninas, compostos fenólicos, alcalóides, etc. (APPERT; ZÓN; AMRHEIN, 2003). Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com AS e um isolado de *C. lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o AS induziram a atividade da FAL, porém, a magnitude dessa atividade variou em função do cultivar. Gális; Smith e Jamenson (2004), também induziram resistência em feijoeiro com AS e, observaram aumento na expressão da FAL. Nenhum trabalho com ASM ou rizobactéria em feijoeiro foi encontrado onde se avaliou a atividade da FAL, porém em outras culturas, Vidhyasekaram et al. (2001), trabalhando como o arroz e, Ramamoorthy; Raguchander e Samiyappan (2002), trabalhando com tomate e pimenta utilizando *P. fluorescens* observaram aumento na atividade da FAL. No entanto, Ramamoorthy; Raguchander e Samiyappan (2002) constataram aumento somente após o desafio com *P. aphanidermatum*, enquanto que, o desafio sem indução prévia não alterou a atividade desta enzima. Silva et al. (2003), induzindo resistência em tomateiro com *B. cereus* através do tratamento de sementes, não observaram alterações na atividade da FAL, embora a atividade de peroxidase tenha sido elevada em 10 vezes.

#### **2.4.4 Atividade de protease**

A atividade de protease aumentou de forma significativa para as plantas que foram tratadas com o indutor ASM. Isso significa que o processo de degradação de proteínas é intensificado, possivelmente devido à demanda por substrato para a produção de toda a maquinaria enzimática responsável pelos mecanismos de defesa. A degradação é necessária para balancear o metabolismo total e equilibrar os custos dentro da planta (SOMSSICH; HAHLBROCK, 1998), possivelmente aproveitando aminoácidos dentro de um conjunto de enzimas e proteínas que são abundantes, como as do metabolismo primário (LOGEMANN et al., 1995). Neste contexto, Weidhase et al. (1987) observaram a formação de novas proteínas, em detrimento de outras moléculas, como clorofila, bem como redução da atividade de Rubisco, em folhas de cevada, com resistência induzida por AJ. Reinbothe; Reinbothe e Parthier (1993) observaram a formação de um determinado grupo de proteínas em cevada, e em contrapartida a redução do nível de proteínas do plastídio, coincidentemente com redução da Rubisco, além de redução no teor de clorofila.

O *B. cereus* não proporcionou aumento significativo na atividade de protease, visto que, de maneira geral, a ativação por rizobactérias não demanda ativação de mecanismos, mas apenas o pré-condicionamento onde a ativação poderia estar acontecendo pela síntese de proteínas ligadas a recepção de sinais na membrana (VERHAGEM et al., 2004). Logo o reordenamento da atividade metabólica não segue a mesma via sinalizadora do ASM.

#### **2.4.5 Aspectos fisiológicos**

##### **2.4.5.1 Respiração**

O indutor *B. cereus* elevou a respiração nos primeiros dias após a aplicação, mas após 6 dias a respiração já havia retornado aos valores do tratamento controle. Porém, avaliando-se ao longo do ciclo da cultura, não elevou a respiração a valores de liberação de carbono significativos, mas no início do ciclo houve uma tendência da respiração ser mais elevada. Já com ASM, a respiração manteve-se elevada por todo o ciclo da cultura para todos os tratamentos, independente do número de aplicações (2, 3 ou 4).

O aumento da respiração no fenômeno da indução de resistência é um processo esperado, uma vez que, com a ativação das defesas, é necessário energia para atender a demanda. Smedegaard-Petersen e Stølen (1981), estudando plantas de cevada que expressavam resistência contra *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, observaram aumento na respiração 24 horas após o contato com o patógeno avirulento. Chen; Su e Kao (2004) também observaram aumentos na respiração do arroz induzidos por AJ, sendo esses aumentos, de acordo com os autores, correlacionados com a redução de sacarose e glicose no tecido foliar. Portanto, a respiração proporcionada pela indução de resistência consome fotoassimilados que poderiam fazer parte dos tecidos de reserva, podendo comprometer a produtividade caso a respiração permaneça elevada durante todo o ciclo.

A diferença entre ASM e *B. cereus*, mais uma vez, demonstra que o ativador abiótico, para induzir os mecanismos de resistência, causando aumentos na respiração, conseqüentemente provendo energia para que as mudanças possam ocorrer. Enquanto que o indutor biótico não promoveu a respiração no mesmo nível, pelo contrário, a alteração da respiração mostrou-se tênue, e isto pode indicar que a não ativação dos mecanismos de defesa diretamente, mas que os mecanismos sejam ativados mais rapidamente quando um patógeno atinge a superfície da planta. Essa observação concorda com o pensamento de Verhagen et al. (2004) que sugerem que o pré-condicionamento, promovido por rizobactérias indutoras de resistência, melhora a comunicação e a percepção na chegada do patógenos para os mecanismos de defesa induzidos via AJ/ET, sendo esta via de menor custo do que a via do AS ativada pelo indutor ASM.

#### **2.4.5.2 Fotossíntese**

Com o indutor ASM, a fotossíntese não foi alterada imediatamente após a primeira aplicação (Figura 8), mas ao longo do ciclo da cultura a mesma foi reduzida (Figuras 9 e 10). Isso mostra que manter defesas latentes ativadas de forma constitutiva pode levar a redução da atividade da fotossíntese, sendo que isso pode significar menor incorporação de carbono e em conseqüência menor crescimento da planta e menor produtividade.

Na literatura, Weidhase et al. (1987) demonstraram que folhas destacadas de cevada, induzidas por AJ ou MeJa, apresentaram redução no teor de clorofila, bem como redução da atividade da Rubisco, correlacionadas com o aparecimento de pelo menos três novas classes de proteínas, que poderiam estar relacionadas a defesa celular. Da mesma forma, Reinbothe; Reinbothe e Parthier (1993), estudando padrões de proteínas em folhas de cevada induzidas por MeJa, observaram a formação de novas proteínas, e, em contrapartida redução no nível de proteína do plastídeo, coincidentemente com redução das grandes e pequenas subunidades da Rubisco e de clorofila. A indução de resistência mediada por ASM pode estar, as custas da degradação das proteínas relacionadas à fotossíntese, reduzindo sua atividade, e assim, gerando um custo metabólico.

Heil et al. (2000) e Dietrich; Ploss e Heil (2005) constataram que o nitrogênio tem papel importante no processo de indução de resistência mediada por ASM. Dessa forma, em ambientes onde esse nutriente é escasso, o custo adaptativo da indução de resistência sempre é maior, visto que, todo o sistema defensivo das plantas é baseado nesse nutriente, através da síntese de enzimas e proteínas relacionadas aos processos de defesa (COLEY; BRYANT; CHAPIN, 1985). Assim, a planta reprime alguns genes, os quais apresentam participação no metabolismo primário, dando maior ênfase para as defesas. Esta repressão pode ocorrer pela falta de matéria prima (nitrogênio, aminoácidos) para a síntese de proteínas relacionadas à defesa, balanceando o metabolismo total e equilibrando os custos dentro da planta, como efeito compensatório (SOMSSICH; HAHLBROCK, 1998). Portanto, se há redução da atividade fotossintética, a qual está relacionada ao crescimento da planta, associada ao aumento da respiração, que efetivamente é a única perda de massa (GAYLER et al., 2004), é obvio que uma redução no crescimento deve ocorrer.

Já com o indutor *B. cereus* não ocorreu alteração da fotossíntese, visto que, como mencionado anteriormente, na indução mediada por rizobactéria, geralmente o efeito não está na ativação de mecanismos de defesa, mas no pré-condicionamento (VERHAGEN et al., 2004).

## 2.4.6 Síntese de compostos de defesa celular

### 2.4.6.1 Fenóis totais

O teor de compostos fenólicos não foi afetado pela aplicação do indutor *B. cereus*, enquanto que com ASM a redução foi significativa após a segunda aplicação para os tratamentos com 3 e 4 aplicações. Os compostos fenólicos podem ser tóxicos aos microrganismos e assim serem considerados como mecanismo de defesa das plantas. Ramamoorthy; Raguchander e Samiyappan (2002) observaram o aumento de compostos fenólicos em plantas de tomate e pimenta, que foram inoculadas com *P. fluorescens* e posteriormente desafiadas com *P. aphanidermatum*. Quando da inoculação com a rizobactéria não houve alteração na composição fenólica e apenas na presença do patógeno houve um pequeno aumento, sendo que a proteção conferida pela rizobactéria poderia estar também associada ao aumento no teor de compostos fenólicos. No entanto, em alguns casos, os produtos da oxidação dos compostos fenólicos pela polifenoloxidase podem ser mais tóxicos, tendo maior eficiência, como destacado por Chérif; Asselin e Bélanger (1994), que observaram em plantas de pepino, com a resistência induzida por silício, aumento na atividade da PFO, associado ao efeito tóxico de compostos fenólicos oxidados na redução da severidade ocasionada por *P. aphanidermatum*. No entanto, esse não é o caso do feijoeiro induzido por *B. cereus* ou ASM, visto que a atividade desta enzima não foi alterada. Outro aspecto a ser considerado, é que nesse período, as plantas estavam passando pela fase do florescimento, portanto, fim do período vegetativo e início da fase reprodutiva, o que significa formação de paredes secundárias, e com isso, maior lignificação (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dessa maneira, os compostos fenólicos, que são substrato para a síntese de lignina (VANCE; KIRK; SHERWOOD, 1980), poderiam sofrer redução no seu teor, amenos que, o processo de síntese de fenóis seja implementado, o que se poderia notar pelo aumento da atividade da FAL, o que não foi observado. Por outro lado, se os indutores causam maior lignificação (veja item 2.3.6.2), sem que haja aumento na atividade da FAL, isso pode resultar em redução no teor de compostos fenólicos, como foi demonstrado neste trabalho.



#### 2.4.6.2 Lignina

A formação de lignina torna a parede celular das células vegetais rígidas e seu principal papel nos vegetais é a sustentação da planta. Sua resistência física e estabilidade química desempenham papel secundário, porém, importante como proteção celular contra insetos, por ser indigerível por esses organismos, além de frequentemente também estar associada ao bloqueio do crescimento de patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Iriti e Faoro (2003a) observaram a formação de lignina em função do tratamento com ASM, o que pode ser um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência do feijoeiro contra *U. appendiculatus*. Segundo Coley; Bryant e Chapin (1985), a lignificação representa um mecanismo de defesa que implica em grande investimento de fotoassimilados, que por sua vez, não apresentam retorno ao metabolismo para serem reutilizados em outros processos, como acontece com outros compostos de defesa móveis na planta, como fenóis, quinonas, enzimas hidrolíticas, etc., considerados menos dispendiosos para as plantas. Outro aspecto não menos importante, é o fato de uma unidade de lignina ser extremamente complexa e demandar uma grande atividade metabólica para sua síntese, sendo necessário um grande número de enzimas responsáveis por diferentes passos metabólicos (AMTHOR, 2003), o que significa demanda por nitrogênio e aminoácidos. A aplicação de ASM em feijoeiro neste trabalho causou aumento na síntese de lignina, corroborando com as observações de Iriti e Faoro (2003a) e podendo estar associada à redução da severidade de *X. axonopodis* pv *phaseoli* em casa de vegetação e *S. sclerotiorum* no campo. Ao mesmo tempo, confirmando as suspeitas de Coley; Bryant e Chapin (1985), podendo ter grande parcela na redução da produtividade do feijoeiro (veja item 2.4.8.2). Porém, o teor de lignina não foi influenciado pela presença de *B. cereus*, associado ainda, ao fato de que não houve redução da produtividade por esse indutor (veja item 2.4.8.2), embora, de alguma forma, tenha ocorrido ativação de defesas, visto que a severidade foi reduzida.

## **2.4.7 Teor de compostos primários no tecido foliar**

### **2.4.7.1 Proteína**

O teor de proteínas se mostrou contrário para os dois indutores, sendo que o ASM tendeu a aumentar o teor de proteínas solúveis, enquanto que o indutor *B. cereus* não só tendeu a diminuir, como exibiu diferença significativa. Esse fenômeno pode ser explicado pelos diferentes tipos de proteínas sintetizadas a partir da indução. Para o indutor ASM, o aumento pode envolver a síntese de proteínas-RP, além de outras proteínas relacionadas a defesa vegetal. Porém, o aumento dessas proteínas demanda substrato, que poderia ser o resultado da degradação de outras proteínas solúveis existentes no protoplasma, como a Rubisco por exemplo, dessa forma fazendo com que a alteração no conteúdo de proteínas solúveis fosse menor. Já com o indutor biótico, o substrato também poderia ser representado por proteínas presentes no protoplasma, porém, o tipo de proteínas sintetizadas, poderiam ser proteínas de membrana, do tipo integrais ou intrínsecas que estão firmemente ligadas as membranas por interações hidrofóbicas, que só podem ser separadas por tratamentos com solventes que rompem a membrana (VOET; VOET, 2006), portanto, não solúveis em tampões aquosos. Assim, se poderia explicar a redução do teor de proteínas solúveis no tecido de plantas com resistência induzida por *B. cereus*.

Nas plantas resistentes nem sempre seus principais mecanismos de defesa são constitutivos, mas podem ser mecanismos latentes, que são expressos depois da chegada do patógeno, porém, no momento certo, com velocidade e magnitude adequadas. Contudo, para isso é preciso receptores (proteínas de membrana), que percebam rapidamente as mudanças no exterior da célula, bem como, a existência de uma via de sinalização eficiente, que faça com que a informação chegue rapidamente no núcleo, para se iniciar o processo de expressão dos mecanismos de defesa.

### **2.4.7.2 Açúcares redutores**

Os açúcares redutores exibiram uma pequena tendência em aumentar seu conteúdo com o indutor ASM, o que pode evidenciar uma inversão no processo de armazenamento, visto que, para a planta manter um nível respiratório mais elevado há necessidade de açúcares simples como glicose, frutose e sacarose disponíveis. No

entanto, Chen; Su e Kao (2004) observaram efeito contrário, sendo que o aumento na respiração estava correlacionado com redução do teor de sacarose e glicose em folhas de arroz com resistência induzida por AJ.

## **2.4.8 Produção**

### **2.4.8.1 Massa seca das plantas**

A massa seca das plantas reflete a quantidade de carbono incorporado ao sistema, e conseqüentemente mostrando o crescimento das plantas. A aplicação de ASM causou redução no crescimento do feijoeiro, acentuando-se, na medida em que se aumentou o número de aplicações. A redução no crescimento foi observada por Godard et al. (1999), que induziram resistência em couve-flor contra míldio (*Peronospora sp*) aplicando ASM em diferentes concentrações em uma única vez. O crescimento foi reduzido de forma dependente da dose utilizada, no entanto, todas as doses reduziram o crescimento. Com 1,5 mg i.a. L<sup>-1</sup> essa redução foi de 6%, sem, no entanto, reduzir a severidade da doença, já com a dose de 75 mg i.a. L<sup>-1</sup> o crescimento foi reduzido em 25%, com redução da severidade em 80%. Iriti e Faoro (2003b) induziram resistência em feijoeiro com ASM (140 mg i.a. L<sup>-1</sup>) em uma única aplicação, porém, não detectaram diferenças na taxa de crescimento, comprimento de entrenós e expansão foliar ao longo do ciclo da cultura em casa de vegetação.

No presente trabalho, as doses aumentavam em quantidade de aplicações, levando a planta, não apenas a exibir uma resposta logo após a aplicação, mas a manter a resposta de elevação da respiração por todo o ciclo. Se considerarmos que a respiração foi mantida elevada por todo o ciclo da cultura, podemos pensar que possivelmente as plantas tenham incorporado a mesma quantidade de carbono. No entanto, as plantas que receberam maior número de aplicações, perderam parte desse carbono pela respiração, para gerar energia e manter os mecanismos de defesa ativos. Outro fator importante é a fotossíntese, uma vez que, constatou-se redução da sua atividade, pode-se pensar que este efeito está envolvido na menor incorporação de carbono e conseqüente redução no crescimento.

Heil et al. (2000), trabalhando com trigo induzido com ASM (150 mg i.a. L<sup>-1</sup>) em dose única, observaram redução do crescimento em função da concentração de

nitrogênio disponível, ou em função do estágio fenológico da cultura no momento da indução. Dietrich; Ploss e Heil (2005), trabalhando com *Arabidopsis* induzida por ASM (150 mg i.a. L<sup>-1</sup>), observaram redução no crescimento em função da concentração de nitrogênio e da água disponíveis. A alteração no comportamento de crescimento não está somente relacionada a processos internos, mas também com sua interação com os efeitos proporcionados pelo ambiente que circunda essa planta. O nitrogênio tem grande participação no crescimento da planta, sendo o macronutriente de maior absorção, visto que participa de todos os processos bioquímicos das plantas como constituinte de enzimas e proteínas e, portanto, um adequado fornecimento desse nutriente é fundamental para o pleno funcionamento dos processos da planta sem interferir no crescimento (MALAVOLTA, 2006). A água também exerce forte influência no crescimento, visto que é nutriente essencial para todos processos bioquímicos das plantas, além de ser responsável pelo transporte de nutrientes para dentro da planta, principalmente nitrogênio, cuja absorção se dá principalmente por fluxo de massa, sendo carregado pela água, e, por esse motivo um dos primeiros sintomas de deficiência crônica de água é o amarelecimento, devido à deficiência de nitrogênio (MALAVOLTA, 2006). Assim, se a ativação de defesas demanda síntese de novas proteínas e/ou enzimas específicas para este processo, de alguma forma, a planta precisa ceder nitrogênio de outro processo, se o que está vindo da absorção do solo não for suficiente, fazendo com que a planta deixe de investir em crescimento para investir em defesa, como demonstrado por Logeman et al. (1995) e Suzuki et al. (2006). Esses autores notaram em cultura de células de fumo e salsa, respectivamente, mudanças no metabolismo, o qual deixou de expressar proteínas relacionadas a multiplicação celular para investir em proteínas relacionadas a defesa, culminando na redução do crescimento quando essas células tiveram a resistência induzida.

Já com o indutor *B. cereus* não houve alteração no comportamento de crescimento do feijoeiro. Ongena et al. (1999), trabalhando com pepino induzido com o indutor biótico *Pseudomonas putida*, observaram acentuada redução da severidade de *P. aphanidermatum*, porém, não houve redução da massa fresca de parte aérea e houve aumento da massa seca de raízes das plantas induzidas. Os microrganismos que interagem com as plantas podem alterar sua relação com os patógenos, como

observado no trabalho acima, sem interferir no crescimento. Este fenômeno ocorre principalmente devido aos diferentes caminhos pelo qual as plantas podem expressar resistência. As rizobactérias induzem resistência pela via do AJ/ET, sendo que esta via, normalmente interfere na sensibilidade de percepção do patógeno (VERHAGEN et al., 2004), e, quando o patógeno atinge a superfície do hospedeiro, a maior capacidade de percepção deste, leva ao aumento na magnitude e velocidade de resposta dos mecanismos de resistência para conter o avanço do patógeno, reforçando a teoria de que *B. cereus* poderia ter induzido resistência sem ativar mecanismos diretamente, mas sim genes envolvidos na percepção do patógeno. Porém, o custo da indução de defesas só poderia ser medido após a chegada do patógeno, como sugerem Walters e Boyle (2005), mas o maior objetivo do presente trabalho foi avaliar o custo da resistência induzida, antes da chegada do patógeno.

#### **2.4.8.2 Produtividade, parâmetros de produção e qualidade**

A produtividade do feijoeiro com resistência induzida por ASM foi reduzida em função do número de aplicações, e, na medida em que se aumentava o número de aplicações, mais a produtividade era reduzida. Notou-se que com 2 aplicações, as plantas produziram em média, cerca de 22,9% a menos, porém, não foi significativo, e, com 3 e 4 aplicações a produtividade foi reduzida em 29,7 e 30,7%, sendo significativamente menor. Esta redução se deu principalmente pela redução do número de grãos e número de grãos por vagem. Embora não houvesse diferença significativa, o número de vagens também exibiu tendência de redução, contudo, não afetando o tamanho do grão. Iriti e Faoro (2003b), em trabalho de campo com feijoeiro induzido com ASM (140 mg i.a. L<sup>-1</sup>), detectaram sensível diferença na produção devido ao menor número de vagens e menor peso seco dos grãos. Visto que não houve diferença estatística, os autores consideraram que o indutor ASM não apresentava evidências de custo associado. No entanto, é preciso considerar que, neste caso, foi efetuada apenas uma aplicação, que protegeu a cultura comprovadamente por 14 dias, mas não há ainda estudos que mostrem proteção até o fim do ciclo. Heil et al. (2000) observaram redução da produtividade do trigo em plantas tratadas com ASM em função da deficiência de nitrogênio, mas também em função da época de aplicação do indutor. A

maior ou menor demanda por um determinado nutriente dentro da planta está em função do estágio fenológico, sendo que, em culturas anuais há períodos de maior exigência, diminuindo posteriormente (MALAVOLTA, 2006). No trabalho de Heil et al. (2000), quando o ASM foi aplicado após o término do perfilhamento, não foi notada a ocorrência de custos, porém, antes desse prazo, o efeito se deu principalmente pela redução do número de perfilhos. Antes do término do perfilhamento, ocorre uma disputa por esse nutriente na planta, e a reprogramação metabólica faz sobressair o sistema defensivo restringindo o crescimento (HEIL et al., 2000). Efeitos semelhantes da reprogramação metabólica podem estar afetando a produtividade do feijoeiro. No entanto, é preciso verificar quais são os períodos de maior demanda desse nutriente, associado a indução de resistência no feijoeiro.

Com o indutor *B. cereus* não houve alteração na produtividade, embora resistência induzível tenha sido ativada. Nandakumar et al. (2001), induzindo resistência em arroz com o indutor biótico *P. fluorescens* contra *R. solani*, combinando diferentes formas de tratamentos (sementes, aplicação no solo, imersão de raízes e aplicação foliar), conseguiram reduções na severidade de até 51% e aumentos na produtividade de até 25%. Em comparação com fungicida (carbendazin), cujo melhor resultado foi redução de 50% da severidade da doença, a produtividade foi melhorada em apenas 14%, portanto inferior a produtividade proporcionada pelo indutor biótico. Ainda neste trabalho, a aplicação foliar de *P. fluorescens* reduziu a doença em 26% e o aumento da produtividade foi de 16%. Kehlenbeck e Schönbeck (1995) induziram resistência em cevada, com aplicação de filtrado de *Bacillus subtilis* e observaram a redução da doença em 40%, associada ao aumento de 25% na produtividade, bem como melhora na qualidade do grão, com aumento do teor de amido em 30%, enquanto que o fungicida (propiconazole) aumentou a produtividade em apenas 14%, embora a redução da doença tenha sido de 90%. Os trabalhos acima mencionados apresentam aumento de produtividade por parte das plantas em função dos indutores bióticos, no entanto, estes indutores apresentam características que os classificam como promotores de crescimento. O *B. cereus* utilizado não apresenta essas características, apenas a capacidade de induzir resistência contra patógenos, portanto, não poderia aumentar a produtividade.

Até o momento, não encontramos na literatura trabalhos em que indutores bióticos tenham causado redução da produtividade. Nesse contexto, Verhagen et al. (2004) avaliaram 8.000 genes de *Arabidopsis* em resposta ao tratamento com rizobactérias promotoras de crescimento. Desses genes, apenas 97 mostraram alterações nas raízes, sendo que nenhum mostrou alteração na parte aérea, embora as plantas estivessem protegidas contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, *Alternaria brassicicola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* e *Peronospora parasitica*. Os autores observaram que entre os genes expressos diferencialmente, nessas plantas pré-condicionadas pelo tratamento com rizobactérias e desafiadas com *P. syringae* pv. *tomato*, 35% eram induzidos via AJ/ET, 17% pelo sinergismo das vias do AJ/ET + AS e apenas 3% pela via do AS, além de 45% serem induzidos por outras vias de sinalização. Quando a planta era induzida por tratamento com o patógeno, que induz a via do ácido salicílico, semelhante ao efeito do ASM, apenas 30% dos genes eram induzidos via AJ/ET, 22% pelo sinergismo de AJ/ET + AS e 12% pela via do AS, enquanto que 36% eram induzidos por outras vias. Esses resultados podem indicar que a via do AJ/ET, normalmente induzida por rizobactérias, apresenta custo inferior em relação à via do AS, induzida por ASM.

### 3 CONCLUSÕES

Os indutores *B. cereus* e ASM induziram resistência em feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum*;

O indutor biótico *B. cereus* alterou o metabolismo do feijoeiro sem interferir na produtividade e melhorando a qualidade da produção;

O indutor abiótico ASM alterou acentuadamente o metabolismo do feijoeiro, gerando um custo metabólico e redirecionando seus fotoassimilados para aparentemente investir em defesas, ocasionando redução da produtividade.



## REFERÊNCIAS

- ADLER, L.S. The ecological significance of toxic nectar. **Oikos**, Kobenhavn, v. 91 p. 409-420, 2000a.
- ADLER, L.S. Alkaloid uptake increases fitness in an hemiparasitic plant via reduced herbivory and increased pollination. **American Naturalist**, Chicago, v. 156, p. 92-99, 2000b.
- AGRAWAL, A.A.; GORSKI, P.M.; TALLAMY, D.W. Polymorphism in plant defense against herbivory: constitutive and induced resistance in *Cucumis sativus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, p. 2285-2304, 1999.
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5<sup>th</sup> ed San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- AMTHOR, J.S. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, p. 673-695, 2003.
- APPERT, C.; ZÓN, J.; AMRHEIN, N. Kinetic analysis of the inhibition of phenylalanine ammonia-lyase by 2-aminoindan-2-phosphonic acid and other phenylalanine analogues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 62, p. 415-422, 2003.
- ARIE, M.; HIKICHI, K.; TAKAHASHI, K.; ESAKA, M. Characterization of a basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 110, p. 232-239, 2000.
- ASP, N.G.; JOHANSSON, C.G.; HALLMER, H.; SILJESTROEM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.31, p.476-482, 1983.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16<sup>th</sup> ed Washington: AOAC, 1995. 2v.
- AYDIN, N.; KADIOGLU, A. Changes in the chemical composition, polyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 27, p. 85-92, 2001.
- BACH, E.E.; BARROS, B.C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivated conidial suspension. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 411-418, 2003.
- BALDWIN, I.T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native population. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 95, p. 8113-8118, 1998.

BALDWIN, I.T.; CALLAHAN, P. Autotoxicity and chemical defense: nicotine accumulation and carbon gain in solanaceous plants. **Oecologia**, Berlin, v. 94, p. 534-541, 1993.

BALDWIN, I.T.; SCHMELZ, E.A.; ZHANG, Z.-P. Effect of octadecanoid metabolites and inhibitors on induced nicotine accumulation in *Nicotiana sylvestris*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, p. 61-74, 1996.

BALDWIN, I.T.; ZHANG, Z.-P.; DIAB, N.; OHNMEISS, T.E.; McCLOUD, E.S.; LYNDS, G.Y.; SCHMELZ, E.A. Quantification, correlations and manipulation of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. **Planta**, Berlin, v. 201, p. 397-404, 1997

BARBER, M.S.; RIDE, J.P. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 32, p. 185-197, 1988.

BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1761-1778, 2005.

BAYSAL, Ö.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defense-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 747-753, 2003.

BÉCOT, S.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; MONOT, C.; SILUÉ, D. Fitogard® (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 417-425, 2000.

BEFFA, R.; MEINS Jr., F. Pathogenesis-related functions of plant  $\beta$ -1,3-glucanases investigated by antisense transformation – a review. **Gene**, Amsterdam, v. 179, p. 97-103, 1996.

BELL, E.; MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxigenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p.1133-1137, 1993.

BERNARDS, M.A.; FLEMING, W.D.; LLEWELLYN, D.B.; PRIEFER, R.; YANG, X.; SABATINO, A.; PLOURDE, G.L. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 135-145, 1999.

BESSER, K.; JAROSH, B.; LANGEN, G.; KOGEL, K.H. Analysis of gene induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 1, p. 277-286, 2000.

BETTIOL, W.; STADNIK, M.J. Controle alternativo. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Ed.) **Oídios**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 165-192.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed). **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.333-349.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, p.154-168, 2002.

BLILOU, I.; OCAMPO, J.A.; GARCIA-GARRIDO, J.M. Resistance of pea roots to endomycorrhizal fungus or *Rhizobium* correlates with enhanced levels of endogenous salicylic acid. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 1663-1668, 1999.

BOKSHI, A.I.; MORRIS, S.C.; DEVERALL, B.J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, London, v. 52, p. 22-27, 2003.

BOLWELL, G.P.; BUTTT, V.S.; DAVIES, D.R.; ZIMMERLIN, A. The origin of the oxidative burst in plants. **Free Radical Research**, London, v. 23, p. 517-532, 1995.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F., ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa/MG: Editora UFV, 2006. p. 13-18.

BOSTOCK, R.M. Signals conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 99-109, 1999.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 545-580, 2005.

BOSTOCK, R.M.; KARBAN, R.; THALER, J.S.; WEYMAN, P.D.; GILCHRIST, D. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 103-111, 2001.

BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.

BOYLE, C.; WALTERS, D. Induction of systemic protection against powdery mildew in barley: effect on plant growth and development. **New Phytologist**, London, v. 167, p. 607-612, 2005a

- BOYLE, C.; WALTERS, D.R. Sacharin-induced protection against powdery mildew in barley: effect on plant growth and phenylpropanoid metabolism. **Plant Pathology**, London, v. 54, p. 1-10, 2005b
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p. 248-254, 1976.
- BROWNLEADER, M.D.; AHMED, N.; TREVAN, M.; CHAPLIN, M.F.; DEY, P.M. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 1115-1123, 1995.
- BULCKE, M van den.; BAUW, G.; CASTRESANA, C.; van MONTAGU, M.; van DECKERCKHOVE, J. Characterization of vacuolar and extracellular  $\beta(1,3)$ -glucanases of tobacco. Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 86, p. 2673-2677, 1989.
- BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 34-42, 2004.
- CABELO, F.; JORRÍN, J.V.; TENA, M. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities in chickpea (*Cicer arietinum*). Induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 92, p. 654-660, 1994.
- CACHINERO, J.M.; HERVÁS, A.; JIMÉNEZ-DIAS, R.M.; TENA, M. Plant defence reaction against fusarium wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. **Plant pathology**, London, v. 51, p. 765-776, 2002.
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; SILVA, J.B.; OSÓRIO, V.A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 15, p. 129-134, 2003.
- CANTERI, M.G.; SILVA, O.C.; DALLA PRIA, M.; COSTA, J.L.S.; SOUZA, E.D.T.; BERNI, R.F. Principais medidas de controle. In: CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, M. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**. Ponta grossa: Editora UEPG, 1999. p.139-159.
- CARDOSO, E.B.J.N.; FREITAS, S.S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p.121-140, 1992.

CASTRO, O.L.; BACH, E.E. Increased production of  $\beta$ -1,3-glucanase and protein in *Bipolaris sorokiniana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 165-169, 2004.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

CIPOLLINI, D.F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia**, Berlin, v. 131, p. 514-520, 2002.

CIPOLLINI, D.F.; PURRINGTON, C.B.; BERGELSON, J. Cost of induced responses in plants. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, p. 79-85, 2003.

CHEN, C.T.; SU, Y.-S.; KAO, C.H. Changes in soluble sugar content and respiration rate in methyl jasmonate-treated rice leaves. **Botanical Bulletin Academic Sinica**, Taipei, v. 45, 197-202, 2004.

CHÉRIF, M.; ASSELIN, A.; BÉLANGER, R.R. Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* sp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, p. 236-242, 1994.

CLARKE, S.F.; BURRITT, D.J.; JAMESON, P.E.; GUY, P.L. Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis-related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with white clover mosaic potexvirus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 195-207, 1998.

COHEN, Y.; GISI, U.; MÖSINGER, E. Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 38, p. 255-263, 1991.

COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, p. 267-273, 1999.

COLEY, P.D.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, Washington, v. 230, p.895-899, 1985.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant science**, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002.

CONSTABEL, C.P.; BERGEY, D.R.; RYAN, C.A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 92, p. 407-411, 1995.

COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 273-282, 2002.

COQUOZ, J.L.; BUCHALA, A.J.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.-P. Arachidonic acid treatment of potato plants induces local synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 1219-1224, 1995.

CORDIER, C.; POZO, M.J.; BAREA, J.M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 11, p. 1017-1028, 1998.

CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 709-712, 1993.

COSTA, H.S.; RIOS-RUIZ, W.F.; LAMBAIS, M.R. Ácido salicílico inibe a formação de micorrizas arbusculares e modifica a expressão de quitinases e  $\beta$ -1,3 glucanases em raízes de feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 1-14, 2000.

CULLIMORE, J.V.; RANJEVA, R.; BONO, J.-J. Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, p. 24-30, 2001.

CUTT, J.R.; KLESSIG, D.F. Pathogenesis-related proteins. In: BOLLER, T.; MEINS Jr., F. **Plant gene research: Genes involved in plant defense**, Wien: Springer-Verlag, 1992. p. 209-243.

DAAYF, F.; SCHMITT, A.; BÉLANGER, R.R. The effect of plant extracts of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. **Plant Disease**, St Paul, v. 79, p. 577-580, 1995.

DALISAY, R.F.; KUĆ, J.A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, p. 315-327, 1995.

DANN, E.; DIERS, B.; BYRUM, J.; HAMMERSCHMIDT, R. Effect of treating soybean with 2,6-dicloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 271-278, 1998.

DANN, E.K.; DEVERALL, B.J. Effectiveness of systemic resistance in bean against foliar and soilborne pathogens as induced by biological and chemical means. **Plant Pathology**, London, v. 44, p. 458-466, 1995.

- DANN, E.K.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J.-P.; DEVERALL, B.J. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 307-319, 1996.
- DAWSON, C.R.; TARPLEY, W.B. Coper oxidase. In: SUMNER, J.B.; MYRBÄCK, K. **The enzymes**. Chemistry and mechanisms of action. New York: Academic Press, 1951. p. 454-498,
- DAYAN, F.E.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O.; JACOBS, N.J. Thiol-dependent degradation of protoporphyrin IX by plant peroxidases. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 444, p. 227-230, 1999.
- DE MARCO, A.; GUZZARDI, P.; JAMET, É. Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 371-381, 1999.
- DERCKEL, J.-P., LEGENDRE, L., AUDRAN, J.-C., HAYE, B.; LAMBERT, B. Chitinases of the grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. **Plant Science**, Amsterdam, v. 119, p. 31-37, 1996.
- DESIKAN, R.; A.-H.MACKERNESS, S.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 159-172, 2001.
- DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, p. 896-906, 2004.
- DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, p. 211-222, 2005.
- DING, C.-K.; WANG, C.Y.; GROSS, K.C.; SMITH, D.L. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. **Planta**, Berlin, v. 214, p. 895-901, 2002.
- DI PIERO, R.M.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência e a produtividade das culturas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 239-255.
- DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1085-1097, 1995

- DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v. 64, p. 351-359, 1999.
- DUMAS-GAUDOT, E.; SLEZACK, S.; DASSI, B.; POZO, M.J.; GIANINAZZI- PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and beta-1,3 glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant and Soil*, The Hague, v. 185, p. 211-221, 1996.
- ESPELIE, K.E.; KOLATTUKUDY, P.E. Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (*Solanum tuberosum*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 240, p. 539-545, 1985.
- ESPELIE, K.E.; FRANCESCHI, V.R.; KOLATTUKUDY, P.E. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 487-492, 1986.
- EVERDEEN, D.S.; KIEFER, S.; WILLARD, J.J.; MULDOON, E.P.; DEY, P.M.; LI, X.-B.; LAMPORT, T.A. Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors *in vitro*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 87, p. 616-621, 1988.
- FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, Baltimore, v. 4, p. 129-134, 1992.
- FIALHO, M.B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal de pinta preta dos citros**. 2004. 60p. Dissertação (Mestrado na area de fitopatologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FLURKEY, W.H. Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 481-483, 1989.
- FNP Consultoria & Comércio. Feijão. In: \_\_\_\_\_. **Agriannual 2006**: anuário de agricultura brasileira, São Paulo, 2006. p. 301-309.
- FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M.G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.-P.; KESSMANN, H.; RAYLS, J. Benzothiadiazole derivate induces systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 61-70, 1996.
- FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v. 37, p. 165-186, 1986.
- FUKAMIZO, T.; KRAMER, K.J. Mechanisms of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 15, p. 141-145, 1985.



- GÁLIS, I.; SMITH, J.L.; JAMENSON, P.E. Salicylic acid-, but not cytokinin-induced, resistance to WCIMV is associated with increased expression of SA-dependent resistance genes in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, p. 459-466, 2004.
- GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the "trade off" between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v. 18, p. 363-371, 2004.
- GAZARYAN, I.; LAGRIMINI, L.M. Tobacco anionic peroxidase overexpressed in transgenic plants: aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, p. 1271-1278, 1996.
- GEETHA, H.M.; SHETTY, H.S. Induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola* using benzothiadiazole, calcium chloride and hydrogen peroxide – a comparative evaluation. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 601-610, 2002.
- GERHARDT, L.B.A., SACHETTO-MARTINS, G., CONTARINI, M.G., SANDRONI, M., FERREIRA, R.P., LIMA, V.M., CORDEIRO, M.C., OLIVEIRA, D.E.; MARGIS-PINHEIRO, M. *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 419, p. 69-75, 1997.
- GODARD, J-F.; ZIADI, S.; MONOT, C.; LE CORRE, D.; SILUÉ, D. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**, Guildford, v. 18, p. 397-405, 1999.
- GONZÁLES, A.I.; POLANCO, C.; RUIZ, M.L. Protein pattern changes induced by culture filtrate of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) explants cultured *in vitro*. **Agronomie**, Paris, v. 20, p. 673-682, 2000.
- GOORMACHTIG, S.; LIEVENS, S.; van de VELDE, W.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Srchi13, a novel early nodulin from *Sesbania rostrata*, is related to acidic class III chitinases. **Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 905-915, 1998.
- GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITEC, G.; HENGY, BECKHOVE, U.; KARL-HEINZ, K.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 629-643, 1996.
- GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***, 2004. 236p. Tese (Doutorado na área de energia nuclear na agricultura), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.144, n.9/10, p.449-454, 1996.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**, Boca Raton: CRC-Lewis Publishers, 1997. p. 177-199.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. To challenge or not to challenge: determining the cost of induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 1-2, 2005a.

HAMMERSCHMIDT, R. Phenols and plant-pathogens interaction: the saga continues. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 77-78, 2005b.

HAMMERSCHMIDT, R. Silicon and plant defense: the evidence continue to mount. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 117-118, 2005c.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUĆ, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, p. 61-71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.-P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 1-6, 2001.

HATCHER, P.E.; PAUL, N.D. On integrating molecular and ecological studies of plant resistance: variety of mechanisms and breadth of antagonists. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 88, p. 702-706, 2000.

HEIJARI, J.; NERG, A.M.; KAINULAINEN, P.; VIIRI, H.; VOURINEN, M.; HOLOPAINEN, J.K. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defence and resistance against *Hylobius arietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 115, p. 117-124, 2005.

HEIL, M. Systemic acquired resistance: available information and open ecological questions. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 341-346, 1999.

HEIL, M. Different strategies for studying ecological aspects of systemic acquired resistance (SAR). **Journal of Ecology**, Oxford, v. 88, p. 707-708, 2000.

HEIL, M. The ecological concept of cost of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 137-146, 2001.

HEIL, M. Ecological costs of induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 1-6, 2002.

HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 503-512, 2002.

HEIL, M.; BALDWIN, I.T. Fitness cost of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, p. 61-67, 2002.

HEIL, M.; HILPERT, A.; KAISER, W.; LINSENMAIR, K.E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation cost? **Journal of Ecology**, Oxford, v. 88, p. 645-654, 2000.

HERMS, D.A.; MATTSON, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**, New York, v. 67, p. 283-335, 1992.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HOFFMANN, L.V.; CARDOSO, E.J.B.N. Inibição da colonização por *Bradyrhizobium elkani*, mas não por *Glomus intraradices* em soja pelo ativador de defesa vegetal BTH. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 795-799, 2001.

HOLTON, T.A.; CORNISH, E.C. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1071-1083, 1995.

HWANG, B.K.; SUNWOO, J.Y.; KIM, Y.J.; KIM, B.S. Accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid-induced resistance of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 305-322, 1997.

IRITI, M.; FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 151, p. 171-180, 2003a.

IRITI, M.; FAORO, F. Does benzothiadiazole-induced resistance increase fitness cost in bean? **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 85, n. 4(special issue), p. 265-270, 2003b.

ISELI, B.; ARMAND, S.; BOLLER, T.; NEUHAUS, J.-M.; HENRISSAT, B. Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 382, p. 186-188, 1996.

ITO, H.; HIRAOKA, N.; OHBAYASHI, A.; OHASHI, Y. Purification and characterization of rice peroxidases. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 55, p. 2445-2454, 1991.

- JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, p. 1349-1359, 1984.
- JUNG, W.-J.; JIN, Y.-L.; KIM, Y.-L.; KIM, Y.-C.; KIM, K.-Y.; PARK, R.-D.; KIM, T.-H. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 645-652, 2004.
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 60, p. 969-976, 1970.
- KAUFFMANN, S., LEGRAND, M., GEOFFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3209-3212, 1987.
- KAPULNIK, Y.; VOLPIN, H.; ITZHAKI, H.; GANON, D.; GALILI, S.; DAVID, R; SHAUL O.; ELAD, Y.; CHET. I.; OKON, Y. Suppression of defense responses in mycorrhizal alfalfa and tobacco roots. **New Phytologist**, London, v. 133, p. 59-64, 1996.
- KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 8, p. 809-824, 2003.
- KATZ, V.A.; THULKE, O.U.; CONRATH, U. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, p. 1333-1339, 1998.
- KAWANO, T.; MUTO, S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 685-693, 2000.
- KEEFE, D.; HINZ, U.; MEINS JUNIOR., F. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. **Planta**, Berlin, v. 182, p. 43-51, 1990.
- KEHLENBECK, H.; SCHÖNBECK, F. Effects of induced resistance on disease severity/yield relations in mildewed barley. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 143, p. 561-567, 1995.
- KHANAM, N.N.; KIHARA, J.; HONDA, Y.; TSUKAMOTO, T.; ARASE, S. Studies on red light-induced resistance of broad bean to *Botrytis cinerea*: I. Possible production of suppressor and elicitor by germinating spores of pathogen. **Journal of General Plant Pathology**, Sapporo, v. 71, p. 285-288, 2005.
- KHODARY, S.E.A. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. **International Journal of Agriculture & Biology**, Pakistan, v. 6, p. 5-8, 2004.

KIM, Y.C.; BLEE, K.A.; ROBINS, J.; ANDERSON, A.J. Oxicom™ under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 129-136, 2001.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. **Plant Pathology**, London, v. 128, p. 1046-1056, 2002

KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S.; SCHMITT, A. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, p. 649-656, 1998.

KRAMER, J.K.; KOGA, D. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. **Insect Biochemistry**, Oxford, v. 16, p. 851-877, 1986.

KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, p. 887-900, 1997.

KRISTENSEN, B.K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S.K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 1237-1245, 1997.

LAGRIMINI, L.M.; ROTHSTEIN, S. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and *Tobacco mosaic virus* infection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 438-442, 1987.

LAGRIMINI, L.M.; JOLY, R.J.; DUNLAP, J.R.; LIU, T.-T.Y. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, p. 887-895, 1997.

LAMBAIS, M.R.; MEDHY, M.C. Suppression of endochitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and chalconase isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 6, p. 75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R.; MEDHY, M.C. Distribution expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. s533-s540, 1995.

LAMBAIS, M.R.; MEDHY, M.C. Soybean roots infected by *Glomus intraradices* strains differing in infectivity exhibit differential chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase expression. **New Phytologist**, London, v. 134, p. 531-538, 1996.

LAMBAIS, M.R.; MEDHY, M.C. Spatial distribution of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases transcripts in bean mycorrhizal roots under low and high phosphate conditions. **New Phytologist**, London, v. 140, p. 33-42, 1998.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 4, p. 251-275, 1997.

LANGE, J.; MOHR, U.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; VÖGELI-LANGE, R. Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 1135-1144, 1996.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp) seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 199-208, 2001.

LAWTON, K.A.; WEYMANN, K.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; UKNES, S.; RYALS, J. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 8, p. 863-870, 1995.

LAWTON, K.A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DENEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, L. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal**, Oxford, v. 10, p. 71-82, 1996.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.B.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 5, p. 235-280, 1997.

LÉON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1673-1678, 1995.

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

LIANG, X.; DRON, M.; CRAMER, C.L.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environment cues. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, p. 14486-14492, 1989.

LIU, H.; JIANG, W.; BI, Y.; LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 35, p. 263-269, 2005.

LOGEMANN, E.; WU, S-C.; SCHRÖDER, J; SCHMELZER, E.; SOMSSICH, I.E.; HAHLBROCK, K. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. **Plant Journal**, Oxford, v. 8, p. 865-878, 1995.

LOTAN, T.; ORI, N.; FLUHR, R. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. **Plant Cell**, Baltimore, v. 1, p. 881-887, 1989.

LOUWS, F.J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; JONES, J.B.; SHOEMACKER, P.B.; SAHIN, F.; MILLER, S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, p.481-488, 2001.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, p. 244-249, 1999.

LYNCH, J.M. (Ed.) **The Rhizosphere**. Chichester: Wiley Interscience, 1990. 458p.

LYON, G.D.; NEWTON, A.C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, London, v. 46, p. 636-641, 1997.

MADI, L.; KATAN, J. *Penicillium janczewskii* and its metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 163-175, 1998.

MALECK, K.; LEVINE, A.; EULGEM, T.; MORGAN, A.; SCHMID, J.; LAWTON, K.A.; DANGL, J.L.; DIETRICH, R.A. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **Nature Genetics**, Amsterdam, v. 26, p. 403-410, 2000.

MANANDHAR, H.K.; JØRGENSEN, H.J.L.; MATHUR, S.B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V. Resistance to rice blast induced by ferric chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, p. 323-329, 1998.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**, São Paulo: Editora Agrônômica Ceres, 2006. 631p.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Coord.) **Manual de práticas em fitobacteriologia**, Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p. 37-47.

MARKOVICH, N.A.; KONONOVA, G.L. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 39, p. 341-351, 2003.

- MARTINEZ-ABARCA, F.; HERRERA-CERVERA, J.A.; BUENO, P.; SANJUAN, J.; BISSELING, T.; OLIVARES, J. Involvement of salicylic acid in establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfafa symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 11, p. 153-155, 1998.
- MAUCH, F; STAEHELIN, L.A. Functional implications of the subcelular localization of ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, Baltimore, v. 1, p. 447-457, 1989.
- MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 203-212, 1996.
- MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.-P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 535-540, 1998.
- MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-215, 1979.
- MEIER, B.M., SHAW, N.; ŚLUSARENKO, A.J. Spatial and temporal accumulation of defence gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v. 6, p. 453-466, 1993.
- MELAN, M.A.; DONG, X.; ENDARA, M.E.; DAVIS, K.R.; AUSUBEL, F.M.; PATERMANN, T.K. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 441-450, 1993.
- MEYER, G.; HÖFTE, M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. **Phytopatology**, Lancaster, v. 87, p. 588-593, 1997.
- MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Amsterdam, v. 162, p. 491-498, 2002.
- MONOT, C.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; SILUÉ, D. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control**, Orlando, v. 24, p. 75-81, 2002.
- MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasilia, v. 27, p. 175-190, 1992.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**, LAVRAS: EDITORA UFLA. 2002. 625p.



MORGAN, J.A.; BENDING, W.G.D.; WHITE, P.J. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1729-1739, 2005.

MURPHY J.F.; ZEHNDER, G.W.; SCHUSTER, D.J.; SIKORA, E.J.; POLSTON, J.E.; KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. **Plant Disease**, St Paul, v. 84, p. 779-784, 2000.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 603-612, 2001.

NORMANLY, J.P.; SLOVIN, J.; COHEN, J. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 323-329, 1995.

OKOT-KOTBER, M.; LIAVOGA, A.; YONG, K.-J.; BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 2410-2417, 2002.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C.; CORNÉLIS, P.; KOEDAM, N.; BÉLANGER, R.R. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. **Plant Pathology**, London, v. 48, p.66-76, 1999.

ONGENA, M.; GIGER, A.; JACQUES, P.; DOMMES, J.; THONART, P. Study of bacterial determinants involved in the induction of systemic resistance in bean by *Pseudomonas putida* BTP1. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 187-196, 2002.

ORI, N.; SESSA, G.; LOTAN, T.; HIMMELHOCH, S.; FLUHR, R. A major stylar matrix polypeptide (SP41) is a member of the pathogenesis-related protein superclass. **EMBO Journal**, Oxford, v. 9, p.3429-3436, 1990.

OROZCO-CÁRDENAS, M.L.; NARVAEZ-VÁSQUES, J.; RYAN, C.A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Baltimore, v. 13, p. 179-191, 2001.

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, v. 1, 1995. p.193-217.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**, 1998. 123 p. Tese (Livre-Docência) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1998.

PAULA JUNIOR, T.J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2.ed. Viçosa/MG: Editora UFV, 2006. p. 360-414.

PAYNE, G.; WARD, E.; GAFFNEY, T.; AHL-GOY, P.; MOYER, M.; HARPER, A.; MEINS JR., F.; RYALS, J. Evidence for a third structural class of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 15, p. 797-808, 1990.

PENG, X.; ZHANG, H.; BAI, Z.; LI, B. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 32, p. 377-387, 2004.

PENNINCKX, I.A.M.A.; THOMMA, B.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.-P.; BROEKAERT, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 2103-2113, 1998.

PENNINCKX, I.A.M.A.; EGGERMONT, K.; TERRAS, F.R.G.; THOMMA, B.P.H.J.; DE SAMBLANX, G.W.; BUCHALA, A.; MÉTRAUX, J.-P.; MANNERS, J.M.; BROEKAERT, W.F. Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 2309-2323, 1996.

PESSANHA, G.G.; FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J.; GROSZMANN, A.; BRITO, D.P.P.S. Correlação negativa da nodulação com a produção de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em solos onde nitrogênio não é fator limitante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 7, p.49-56, 1972.

PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 52-58, 1999.

PIETERSE, C.M.J.; VAN WEES, S.C.M.; VAN PELT, J.A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, H.; WEISBEEK, P.J.; VAN LOON, L.C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 10, p. 1571-1580, 1998.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; KEURENTJES, J.J.B.; VERHAGEN, B.W.M.; KNOESTER, M.; VAN DER SLUIS, I.; BAKKER, P.A.H.M.; VAN LOON, L.C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling, and expression. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 51-61, 2001.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B.W.M.; LEÓN-KLOOSTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; RESENDE, M.L.V.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

POTTER, S.; UKNES, S.; LAWTON, K.; WINTER, A.M.; CHANDLER, D; DI MAIO, J.; NOVITZKY, R.; WARD, E.; RYALS, J. Regulation of a heven-like gene in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 6, p. 680-685, 1993.

POZO, M.J., VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Jasmonates - signals in plant-microbe interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 23, p. 211-222, 2004.

PRYS-JONES, O. E.; WILLMER, P. G. The biology of alkaline nectar in the purple toothwort (*Lathraea clandestina*): ground level defences. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 45, p. 373-388, 1992.

PURRINGTON C.B. Cost of resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 305-308, 2002.

QUIROGA, M.; GUERERO, C.; BOTELLA, M.A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; DE FORCHETTI, S.M.; TIGER, H.; VALPUESTA, V. A Tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, p. 1119-1127, 2000.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, p. 429-441, 2002.

RASMUSSEN, J.B.; HAMMERSCHMIDT, R.; ZOOK, M.N. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, p. 1342-1347, 1991.

REDMAN, A.M.; CIPOLLINI JÚNIOR, D.F.; SCHULTZ, J.C. Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Oecologia**, Berlin, v. 126, p.380-385, 2001.

REINBOTHE, S.; REINBOTHE, C.; PARTHIER, B.; Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, p. 10606-10611, 1993.

REUVENI, R.; DOR, G.; RAVIN, M.; REUVENI, M.; TUZUN, S. Systemic resistance against *Sphaeroteca fuliginea* in cucumber plants exposed to phosphate in hydroponics system, and its control by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 355-361, 2000.

REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 26, p. 157-232, 1996.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, EC.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xilella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 167-173, 2003.

- RITTER, H.; SCHULZ, G.E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**, Baltimore, v. 16, p. 3426-3436, 2004.
- RODRIGUES, F.A.; JURICK II, W.M.; DATNOFF, L.E.; JONES, J.B.; ROLLINS, J.A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 144-159, 2005.
- RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 175-179, 1997.
- RUIZ-LOZANO, J.M.; ROUSSEL, H.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 12, p. 976-984, 1999.
- RYALS, J.; NEUENSCHWANDER, U.; WILLITS, M.; MOLINA, A. STEINER, H.Y.; HUNT, M. Systemic acquired resistance. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1809-1819, 1996.
- SAHASHI, N; TSUJI, H; SHISHIYAMA, J. Barley plants grown under germfree condition have increase susceptibility to two powdery mildew fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 34, p. 163-170, 1989.
- SALLES, I.I.; BLOUNT, J.W.; DIXON, R.A.; SCHUBERT, K. Phytoalexin induction and  $\beta$ -1,3-glucanase activities in *Colletotrichum trifolii* infected leaves of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 89-101, 2002.
- SAMAC, D.A.; SHAH, D.M. Developmental and pathogen-induced activation of the Arabidopsis acidic chitinases promoter. **Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 1063-1072, 1991.
- SAMAC, D.A.; HIRONAKA, C.M.; YALLALY, P.E.; SHAH, D.M. Isolation and characterization of the gene encoding basic and acid chitinase in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 907-914, 1990.
- SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão**. 2.ed. Viçosa/MG: Editora UFV, 2006. p. 41-65.
- SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**, Guildford, v. 17, p.307-313, 1998.
- SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; ANDERSON, J.P.; SIMPSON, R.S.; WILSON, I.W.; SOMERVILE, S.C.; MACLEAN, D.J. Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 999-1010, 2003.

SCHMELE, I.; KAUSS, H. Enhanced activity of the plasma membrane localized calose synthase in cucumber leaves with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 37, p. 221-228, 1990.

SCHNEIDER, S.; ULLRICH, W.R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activity in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 45, p. 219-304, 1994.

SCHULTZE, M.; STAEHELIN, C.; BRUNNER, F.; GENETET, I.; LEGRAND, M.; FRITIG, G.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A. Plant chitinase/lysozyme isoforms show distinct substrate specificity and cleavage site preference towards lipo-chitoooligosaccharide Nod signals. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 571-580, 1998.

SHIRAISHI, T.; YAMADA, T.; NICHOLSON, R.L.; KUNOH, H. Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (raça 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 46, p.153-162, 1995.

SIEGRIST, J.; JEBLICK, W.; KAUSS, H. Defense response in infected and elicited cucumber (*Cucumis sativus* L.) hypocotyls segments exhibiting acquired resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1365-1374, 1994.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29. p. 288-295, 2004.

SING, U.P.; PRITHIVIRAJ, B. Nemazal, a product of neem (*Azadirachta indica*), induces resistance in pea (*Pisum sativum*) against *Erysiphe pisi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 181-194, 1997.

SMEDEGAARD-PETERSEN, V.; STØLEN, O. Effect of energy-requiring defense reactions on yield and grain quality in a powdery mildew-resistant barley cultivar. **Phytopathology**, Lancaster, v. 71, p. 396-399, 1981.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **New Phytologist**, London, v. 132, p. 1-45, 1996.

SOARES, R.M.; MARINGONI, A.C. Efeito de acibenzolar-S-metil sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-curtobacterium. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 28, p. 41-45, 2002.

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

SONNEMANN, I.; FINKHAEUSER, K.; WOLTERS, V. Does induced resistance in plants affect the belowground community? **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 179-185, 2002.

SONNEMANN, I.; MIKA, N.; WOLTERS, V. Root associated organisms modify the effectiveness of chemical induced resistance in barley. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 1837-1842, 2005.

STADNIK, M.J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 175-177, 2000.

STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. Controle biológico de oídios. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 2, p. 95-116.

STADNIK, M.J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 25-34, 2000.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. **Fitopatologia Brasileira**, Recife, v. 25, p. 59-66, 2000.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, p. 16-21, 1999.

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

STRAUSS, S.Y.; SIEMENS, D.H.; DECHER, M.B.; MITCHELL-OLDS T. Ecological costs of plant resistance to herbivores in the currency of pollination. **Evolution**, Lancaster, v. 53, p. 1105-1113, 1999.

STRAUSS, S.Y.; RUDGERS, J.A.; LAU, J.A.; IRWIN, R.E. Direct and ecological costs of resistance to herbivory. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 17, p. 278-285, 2002.

SUZUKI, K.; NISHIUCHI, T.; NAKAYAMA, Y.; ITO, M.; SHINSHI, H. Elicitor-induced down-regulation of cell cycle-related gene in tobacco cells. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 183-191, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

THALER, J.S.; STOUT, M.J.; KARBAN, R.; DUFFEY, S.S. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivore. **Ecological Entomology**, London, v. 26, p. 312-324, 2001.

- THEORELL, H. The iron-containing enzymes: B. catalases and peroxidases "hydroperoxidases". In SUMNER, J.B.; MYRBÄCK, K. **The enzymes**, Chemistry and mechanisms of action. New York: Academic Press. 1951. v. 2, n. 1, p. 397-427.
- THIPYAPONG, P.; STEFFENS, J.C. Tomato polyphenol oxidase: differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, p. 409-418, 1997.
- THIPYAPONG, P.; JOEL, D.M.; STEFFENS, J.C. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 707-718, 1997.
- THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 105-117, 2004.
- THOMMA, B.P.H.J.; EGGEERMONT, K.; PENNINGKX, I.A.M.A.; MAUCH-MANI, B.; VOGELSANG, R.; CAMMUE, B.P.A.; BROEKAERT, W.F. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense response pathway in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 95, p. 15107-15111, 1998.
- TOSI, L.; ZAZZERINI, A. Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mosseae* and two plant activators in sunflower plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 735-744, 2000.
- TREUTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 581-591, 2005.
- UKNES, S.; MAUCH-MANI, B.; MOYER, M.; POTTER, S.; WILLIAMS, S.; DINCHER, S.; CHANDLER, D.; SLUSARENKO, A.; WARD, E.; RYALS, J. Acquired resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Baltimore, v. 4, p. 645-656, 1992.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.
- VAMOS-VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 15, p. 49-127, 1981.
- VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 259-288, 1980.
- VAN DAM, N.M.; BALDWIN, I.T. Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 15, p. 406-415, 2001.

- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, p. 85-97, 1999.
- VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453-483, 1998.
- VAN WEES, S.C.M.; LUIJENDIJK, M.; SMOORENBURG, I.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with direct effect on expression of known defense related gene but stimulates the expression of the jasmonate-inducible genes *Atvsp* upon challenge. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 41, p. 537-549, 1999.
- VAN WEES, S.C.M.; SWART, E.A.M. de; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 97, p. 8711-8716, 2000.
- VAN WEES, S.C.M.; PIETERSE, C.M.J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN'T WESTENDE, Y.A.M.; HARTOG, F.; VAN LOON, L.C. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 10, p. 716-724, 1997.
- VAUGHN, K.C.; DUKE, S.O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 60, p. 106-112, 1984.
- VAUGHN, K.C.; LAX, A.R.; DUKE, S.O. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 72, p. 659-665, 1988.
- VERHAGEN, B.W.M.; GLAZEBROOK, J.; ZHU, T.; CHANG, H.-S.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Sant Paul, v. 17, p. 895-908. 2004.
- VIDHYASEKARAN, P.; KAMALA, N.; RAMANATHAN, A.; RAJAPPAN, K.; PARANIDHARAN, V.; VELAZHAHAN, R. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthomonas oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, p. 155-167, 2001.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: Editora UFV, 1988. 213p.
- VIERHEILIG, H.; ALT M.; LANGE, J.; GUTRELLA, M.; WIEMKEN, A.; BOLLER. T. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3031-3034, 1995.



- VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, p. 1-10, 2002.
- VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**, 3.ed. Porto Alegre: Artmed. 2006. 1596p.
- WALTERS, D.R.; BOYLE, C. Induced resistance and allocation cost: what is the impact of pathogen challenge? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 66, p. 40-44, 2005.
- WARDLE, D. A.; BARDGETT, R. D. Human-induced changes in densities of large herbivorous mammals: consequences for the decomposer subsystem. **Frontiers in Ecology and Environment**, Silver Spring, v. 2, p. 145-153, 2004.
- WARDLE, D. A.; WALKER, L. R.; BARDGETT, R. D. Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. **Science**, Washington, v. 305, p. 509-513, 2004.
- WARDLE, D. A.; YEATES, G. W.; BARKER, G. M.; BELLINGHAM, P. J.; BONNER, K. I.; WILLIAMSON, W. Island biology and ecosystem functioning in epiphytic soil communities. **Science**, Washington, v. 301, p. 1717-1720, 2003.
- WARDLE, D. A.; BARDGETT, R. D.; KLIRONOMOS, J. N.; SETÄLÄ, H.; VAN DER PUTTEN, W. H.; WALL, D. H. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. **Science**, Washington, v. 304, p. 1629-1633, 2004.
- WEIDHASE, R.A.; KRAMELL, H.-M.; LEHMANN, J.; LIEBISCH, H.-W.; LERBS, W.; PARTHIER, B. Methyl jasmonate-induced changes in the polypeptide patterns of senescing barley leaf segments. **Plant Science**, Amsterdam, v. 51, p. 177-186, 1987.
- WEISSHAAR, B.; JENKINS, G.I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, p. 251-257, 1998.
- WEN, P.F.; CHEN, J.Y.; KONG, W.F.; PAN, Q.H; WAN, S.B.; HUANG, W.D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, Amsterdam, v. 169, p. 928-934, 2005.
- WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1001-1013, 1995.
- WHIPS, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, p. 487-511, 2001.
- WHITE, J.W.; IZQUIERDO, J. Physiology of yield potential and stress tolerance. In: SCHOONHOVEN, A. VAN VOYSEST, O. **Common beans**. Research for crop improvement, Wallingford: CIAT, 1991. p. 287-382.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Micro-plate colorimetric assay for endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 24, p.511-519, 1992.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemistry Journal**, London, v. 322, p. 681-692, 1997.

WOLFE, B. E.; HUSBAND, B. C.; KLIRONOMOS, J. N. Effects of a belowground mutualism on an aboveground mutualism. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 218-223, 2005.

XIANG, L.; MOORE, B.S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 4286-4289, 2005.

XUE, L.; CHAREST, P.M.; JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 359-365, 1998.

XU, Y; CHANG, P.F.L.; LIU, D.; NARASINHAN, M.L.; RAGHOTHAMA, K.G. HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Plant defense gene are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. **Plant Cell**, Baltimore, v. 6, p. 1077-1085, 1994.

YAMAMOTO, K.; SASAKI, T. Large-scale EST sequencing in rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p.135-144, 1997.

YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. **Cultura do feijoeiro no Brasil**: características da produção, Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 75p.

YOKOYAMA, L.P.; BANNO, K.; KLUTHCOSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Potafoz, p. 1-21, 1996.

ZAVALA, J.A.; PAANKAR, A.G.; GASE, K.; BALDWIN, I.T. Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuate*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 101, p. 1607-1612, 2004.

ZIMMERLI, L.; JAKAB, G.; MÉTRAUX, J.-P.; MAUCH-MANI, B. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by  $\beta$ -aminobutyric acid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 97, p. 12912-12925, 2000.