

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

AÇÃO DO BIOCONTROLADOR COM ATIVIDADE DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária
da UPF, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia – Área de
Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, janeiro de 2006.

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

AÇÃO DO BIOCONTROLADOR COM ATIVIDADE DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO

Orientadora: Dra. Norimar D'Ávila Denardin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, janeiro de 2006.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Cheila Cristina Sbalcheiro, nascida em 12 de março de 1982, natural de Sananduva, RS, Brasil, Bióloga formada em julho de 2003 pelo Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo, RS.

Em março de 2004 iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, na área de Concentração em Fitopatologia, em nível de mestrado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, pela oportunidade e pelo aprimoramento profissional;

À professora orientadora, Dra. Norimar D'Ávila Denardin, pela amizade, carinho, dedicação e apoio durante os trabalhos e pelo exemplo de integridade e profissionalismo;

À Dra. Sandra Patussi Brammer, pela orientação, gratificante amizade, ensinamentos, apoio incondicional e profissionalismo;

A FAMV e a Embrapa Trigo, pelo suporte de laboratórios e demais instalações utilizadas para o êxito do trabalho;

À minha mãe Leonice, irmãos Susana e Paulo e sobrinho Guilherme, que não pouparam esforços para a minha formação, especialmente por todo amor, carinho, dedicação e incentivo constante, pelo exemplo de luta e por acreditarem em mais este passo de minha vida;

À Jacson Rodrigo Telles, pelo carinho, amor, compreensão, incentivo e paciência durante os inúmeros períodos em que estive “estressada”;

À João e Marlene Telles, Loevir e Ermindo Benedetti, pelo apoio, incentivo, carinho, amparo e confiança;

Às amigas Andréia Tumelero, Jucenara Soares, Vanessa Tedesco e Greisse Brambatti, pela amizade, descontração, apoio e ensinamentos;

A todos os professores do Curso que contribuíram para a minha formação;

À Neusa Jorge, Sandra Manssur e Ema Gladis, pela colaboração para execução dos trabalhos e pela amizade;

À Regina Fontanelli, pelo auxílio nas análises estatísticas;

À Deus, pela oportunidade de estar aqui, pela saúde, pela família, pelas oportunidades e pela proteção constante durante este caminho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 A cultura do feijoeiro	7
2.1.1 Doenças do feijoeiro	8
2.1.1.1 Crestamento bacteriano comum do feijoeiro	9
2.2 Controle da doença	11
2.2.1 Controle biológico	12
2.2.1.1 Actinomicetos	14
2.3 Indução de resistência	15
2.3.1 Mecanismos bioquímicos envolvidos na indução	19
2.3.1.1 Proteínas	19
2.3.1.2 Peroxidases	20
2.3.1.3 β -1,3-glucanase	22
2.3.1.4 Fenilalanina amônia-liase	23
2.3.1.5 Polifenoloxidase	25
2.3.1.6 Isoperxidases	25
CAPÍTULO I	
CONTROLE BIOLÓGICO DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO POR ELICITOR BIOLÓGICO	28
Resumo	28
Abstract	29
1 Introdução	30
2 Material e métodos	31
2.1 Extração e quantificação de Xapf em sementes	32

2.1.1 Preparo das amostras	32
2.1.2 Extração de Xapf das sementes	33
2.1.3 Quantificação de Xapf em sementes	33
2.2 Inoculação artificial de sementes com Xapf	34
2.2.1 Preparo do inóculo de Xapf	34
2.2.2 Inoculação das sementes	34
2.3 Microbiolização das sementes com biocontrolador	35
2.3.1 Preparo do biocontrolador	35
2.3.2 Microbiolização das sementes	36
2.4 Experimentos	37
2.4.1 Experimento I	37
2.4.2 Experimento II	37
2.5 Instalação dos experimentos em casa-de-vegetação	38
2.6 Aplicação do biocontrolador na parte aérea da planta	38
2.7 Teste de germinação das sementes	39
2.8 Avaliação da evolução do CBCF	39
2.9 Quantificação da população bacteriana e de actinomicetos no solo após o cultivo	40
2.10 Análise dos resultados	41
3 Resultados e discussão	41
4 Conclusões	52

CAPITULO II

ATIVIDADE ENZIMÁTICA COMO RESPOSTA A AÇÃO DO BIOCONTROLADOR DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO	53
Resumo	53
Abstract	54
1 Introdução	55
2 Material e métodos	57
2.1 Inoculação das sementes	57
2.2 Microbiolização das sementes	57
2.3 Experimentos	58
2.3.1 Experimento I	58
2.3.2 Experimento II	58
2.3.2.1 Aplicação do biocontrolador na parte aérea..	59

2.4 Coleta do tecido foliar	60
2.5 Preparo do extrato vegetal	60
2.5.1 Determinação de proteínas totais	60
2.5.2 Determinação da atividade de peroxidases	61
2.5.3 Determinação da atividade de β -1,3-glucanase	61
2.5.4 Determinação da atividade da fenilalanina amônia- liase	62
2.5.5 Determinação da atividade da polifeniloxidase	63
2.5.6 Representação e análise dos resultados	63
3 Resultados e discussão	64
4 Conclusões	78
CAPÍTULO III	
ATIVIDADE DE ISOPEROXIDASES EM FEIJOEIRO SOB AÇÃO DE UM BIOCONTROLADOR DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM	
Resumo	79
Abstract	80
1 Introdução	81
2 Material e métodos	83
2.1 Inoculação das sementes	83
2.2 Microbiolização das sementes	84
2.3 Experimentos	84
2.3.1 Experimento I	84
2.3.2 Experimento II	85
2.3.3 Experimento III	86
2.3.3.1 Aplicação do biocontrolador na parte aérea .	87
2.4 Eletroforese de isoenzimas	87
2.4.1 Revelação dos géis	88
2.4.2 Análise das isoperoxidasas	89
3 Resultados e discussão	89
4 Conclusões	99
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
CAPÍTULO I		
1	Percentagem de germinação das sementes de feijoeiro submetidas a quatro tratamentos e percentagem de sementes com bactérias e fungos	42
2	Incidência (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) nas folhas de plantas submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador	44
3	Severidade (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador	45
4	Incidência (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) nas folhas de plantas submetidas a aplicação foliar com biocontrolador	48
5	Severidade (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nas plantas submetidas à aplicação foliar com biocontrolador	49
6	Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFCs) de actinomicetos e de bactérias presentes no solo após o cultivo do feijoeiro em diferentes tratamentos de semente com biocontrolador	51
CAPÍTULO II		
1	Concentração de proteínas totais determinadas em amostras de plantas de feijoeiro submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura	65
2	Atividade da peroxidase (PO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura	66

3	Atividade da β -1,3-glucanase determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura	67
4	Atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura	69
5	Atividade da polifenoloxidase (PPO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura	70
6	Concentração de proteínas totais determinadas em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar do biocontrolador	72
7	Atividade da peroxidase (PO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar do biocontrolador	73
8	Atividade da β -1,3-glucanase determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar do biocontrolador	75
9	Atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar com biocontrolador	76
10	Atividade da polifenoloxidase (PPO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação do biocontrolador na parte aérea	77

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1	Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da rota do ácido chiquímico, iniciado pela fenilalanina 24
CAPÍTULO III	
1	Zimograma representando os 15 padrões de bandas de isoperoxidasas em feijoeiro, tratamentos 1 e 2 (A) e tratamentos 3 e 4 (B), com sua respectiva migração relativa (MR), quantidade de plantas (pl) por época de coleta e frequência da banda (FB) 91
2	Zimograma representando os 12 padrões de bandas de isoperoxidasas em feijoeiro ao longo do ciclo da cultura, com sua respectiva migração relativa (MR) e frequência da banda (FB), conforme o tratamento e os diferentes dias após a semeadura 94
3	Zimograma representando os 12 padrões de bandas de isoenzimas de peroxidases em feijoeiro comum, tratamento 1 e 2 (A) e tratamento 3 e 4 (B), com sua respectiva migração relativa (MR) e frequência da banda (FB), conforme os dias após a semeadura 97

**AÇÃO DO BIOCONTROLADOR COM ATIVIDADE DE
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA NO CONTROLE DO
CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

**CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO¹ E NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN²**

RESUMO – O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF), incitado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), é responsável por expressivos danos na cultura e por reduções no rendimento e na qualidade dos grãos. A indução de resistência em plantas contra fitopatógenos é um método alternativo de controle de doenças e envolve a ativação de mecanismos de resistência latentes na planta. Diversas bactérias com capacidade de estimular uma ou mais respostas de defesa e com ação biocontroladora já foram isoladas e caracterizadas. *Actinomicetos* spp. é uma bactéria capaz de elicitar respostas de defesa em algumas plantas. Este trabalho teve por objetivo determinar o potencial do biocontrolador do CBCF e o seu efeito sobre enzimas ligadas à indução de resistência. Foram avaliados dois métodos de aplicação do biocontrolador: via semente e por aspersão da parte aérea da planta. A doença foi significativamente controlada nos tratamentos em que as sementes foram microbiolizadas com biocontrolador. A atividade enzimática das enzimas peroxidase,

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF), Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra. professora da FAMV/UPF – norimar@upf.br

β -1,3-glucanase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase apresentam diferenças entre os tratamentos e nas diferentes épocas do ciclo da cultura. Para o sistema de isoperoxidasas, observaram-se diferenças intra e interpopulacional e diferenças quantitativas entre os tratamentos. Os resultados comprovam a alteração na atividade de enzimas relacionadas com a defesa de plantas, promovidas pelo biocontrolador no crestamento bacteriano comum do feijoeiro.

Palavras-chave: Xanthomonas, actinomiceto, enzimas, isoenzimas, controle biológico.

**ACTION OF RESISTANCE INDUCTION ACTIVITY
BIOCONTROLLER IN THE CONTROL OF THE COMMON
BACTERIAL BLIGHT OF BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.)**

ABSTRACT – The common bacterial blight of beans (CBCF), incited by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), accounts for severe damages in the crop and reductions in grain yield and quality. The induction of resistance in plants against pathogens is an alternate method of disease control, which involves the activation of latent mechanisms of resistance in the plant. A number of bacteria able to stimulate one or more responses of defense and having biocontrol action have been isolated and characterized. *Actinomicetos* spp. is a bacterium capable of eliciting response of defense in some plants. The objective of this work was determine the potential of biocontroller of CBCF and its effect on enzymes linked to resistance induction. Two methods of

application of the biocontroller have been evaluated: seed dressing and aspersion of above-ground plant parts. The disease was significantly controlled in the treatments where the seeds had been microbiolized with biocontroller. The enzymatic activity of the enzymes peroxidase, β -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase showed differences among treatments and the different cycle dates of the crop. For the isoperoxidase system, intra and interpopulation differences, as well as quantitative difference, were observed between the treatments. The results demonstrate alteration in the activity of enzymes related to plant defense, promoted by the biocontroller of the bacterial blight of common beans.

Key words: Xanthomonas, actinomycete, enzyme, isoenzymes, biological control.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), com uma produção de 3 bilhões de toneladas na safra 2004 (IBGE, 2005), além de ser o maior consumidor mundial com 18,4 kg hab⁻¹ ano⁻¹, sendo o Rio Grande do Sul o Estado com maior consumo per capita do país (CEPEF, 2003). A cultura do feijoeiro produz grãos de alto valor protéico (20 a 22%), sendo uma excelente fonte de energia (341 cal/100 g) para a população (SPERS & NASSAR, 1997), o que torna seu consumo vantajoso do ponto de vista nutricional.

Para a obtenção de uma maior produtividade faz-se necessário o emprego de tecnologia baseada na utilização de insumos, uso de cultivares produtivas e resistentes a patógenos, controle de pragas e doenças, e principalmente o uso de sementes de qualidade (NASSER, 1999). Dentre os fatores que afetam a produtividade, estão as perdas ocasionadas por doenças, que podem chegar, em alguns casos a 100%, devido ao manejo inadequado e a falta de medidas de controle (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000).

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) incitado tanto por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) (VAUTERIN et al., 1995) como pela sua variante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), é uma das principais doenças da cultura, e de grande importância nas áreas produtoras de feijão do mundo, principalmente em condições propícias com alta temperatura e umidade. É provável que o CBCF seja a doença de

etiologia bacteriana mais importante no Brasil, presente em todas as regiões onde o feijoeiro é cultivado (ROMEIRO, 1995).

Nos EUA em 1998, foram relatados danos na cultura do feijoeiro devido à ocorrência do CBCF, causando reduções de 75% no rendimento (VENETTE & LAMEY, 2005). No Brasil não há relatos de perdas, porém em campos de pesquisa observaram-se reduções na colheita de 10 a 70%, em condições de ataque natural (DIAZ, 2000).

A semente é o meio de disseminação e sobrevivência do patógeno mais eficiente. Em condições favoráveis, bastam 0,5% de sementes infectadas, para produzir uma epidemia no campo (VALARINI, 1995), além de aumentar o potencial de inóculo a cada ciclo da cultura (HALFELD-VIEIRA & SOUSA, 2000).

O CBCF é uma doença de difícil controle, devido ao cultivo ser realizado em mais de uma época do ano, da dificuldade de obtenção de cultivares comerciais resistentes e da baixa eficiência do controle químico (VALARINI & MENTEN, 1992). Para minimizar os impactos causados pela doença, é necessário que ocorram inspeções a campo e programas de certificação de sementes, juntamente com o manejo integrado de práticas culturais que reduzam a fonte de inóculo e medidas de controle preventivo.

A produção de alimentos oriundos de um sistema de manejo menos agressivo ao meio ambiente, está sendo adotado por inúmeros produtores, visando causar menor impacto no ambiente que os métodos agrícolas convencionais. Apesar dos benefícios com a redução e até com a eliminação do uso de defensivos, a grande diversidade de doenças que atacam a cultura do feijoeiro limitam a

produção, fazendo-se necessária a busca por alternativas viáveis e eficientes para o controle de doenças.

Tendo em vista o impacto do CBCF na cultura, o presente trabalho teve como objetivo estudar dois métodos para o controle preventivo de CBCF através do uso de um biocontrolador de Xapf, por microbiolização de sementes e aplicação na área foliar da planta, bem como estudar a atividade enzimática relacionada com o estado de indução de resistência. Visando a possibilidade de controle da doença, o aumento da produtividade e produção de sementes livres do patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), é cultivado em todo o mundo, em quase todas as regiões, nos mais diferentes climas. É um importante constituinte da dieta do brasileiro, por ser uma excelente fonte protéica vegetal, contendo cerca de 20 a 25% de proteína e pobre em aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína). O feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômico-social, por ser cultivado em grandes extensões de áreas e devido ao emprego de mão-de-obra durante o ciclo da cultura (VIEIRA et al., 1999).

O feijoeiro comum é a espécie mais cultivada no gênero *Phaseolus*, que inclui *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. lunatus*. Contribuindo com cerca de 95% da produção mundial entre os feijões, cultivado em mais de 100 países, destacando-se Índia, Brasil, Estados Unidos e México, responsáveis por 63% do total produzido. O Brasil é o maior consumidor de feijão com 18,4 kg hab⁻¹ ano⁻¹, e o Rio Grande do Sul é o Estado com maior consumo per capita do país (CEPEF, 2003). Embora o país seja consumidor em potencial, a produção brasileira não é suficiente para suprir o consumo interno, apesar de ser o segundo maior produtor mundial de feijão, apresenta um rendimento médio entre os mais baixos do mundo, com cerca de 838 kg ha⁻¹.

Entre os fatores que afetam a produtividade da cultura do feijoeiro destacam-se as perdas ocasionadas por doenças, que em alguns casos podem chegar a 100%, principalmente quando o manejo

não é adequado e as medidas de controle não são adotadas (GILBERTSON & MAXWELL, 1992; SAETTLER, 1991).

2.1.1 Doenças do feijoeiro

O feijoeiro comum é uma planta bastante vulnerável à ação dos agentes ambientais, seja de natureza abiótica (clima) ou biótica (organismos vivos), caracterizado por acentuada instabilidade produtiva (DOURADO NETO & FANCELLI, 2000). Em função da expansão das áreas cultivadas no Brasil e do cultivo sucessivo, principalmente em áreas irrigadas, há uma maior contribuição para o aumento e disseminação dos patógenos. Além de ser hospedeira de inúmeras doenças que diminuem a produtividade da cultura e podem depreciar a qualidade do produto (SARTORATO, 2004).

As doenças de maior ocorrência no feijoeiro podem ser causadas por vírus, fungos e bactérias. Destaca-se o mosaico dourado do feijoeiro (*Bean golden mosaic virus* – BGMV), mosaico comum (*Bean common mosaic virus* – BCMV), crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*), antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), mancha angular (*Phaseoisariopsis griseola*), ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), amarelecimento de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*) entre outras (BIANCHINI et al., 2005).

Dentre as doenças de etiologia bacteriana, destaca-se o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF), por apresentar

expressivos danos de ocorrência generalizada, sobre tudo nas regiões úmidas e quentes.

2.1.1.1 Crestamento bacteriano comum do feijoeiro

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro está entre as principais doenças que afetam a produção do feijoeiro no Brasil. Pode ser causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (VAUTERIN et al., 1995) (Xap) ou pela sua variante *fuscans* (Xapf), (VAUTERIN et al., 1995), que produz um pigmento marrom escuro em meio de cultura. Constituiu-se na mais importante doença de etiologia bacteriana na cultura do feijoeiro comum relatada no Brasil, devido à sua ampla distribuição geográfica, à redução na produção e às dificuldades de controle, agravadas pelo fato do agente causal ser transmitido via semente (ROMEIRO, 1995).

Atualmente, esta doença encontra-se na maioria das áreas produtoras de feijão do mundo. No Brasil, representa uma grande problemática no Norte do Estado do Paraná, no Rio de Janeiro, no Brasil Central e na Zona da Mata de Minas Gerais, além do Estado de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Espírito Santo. O CBCF é uma doença cosmopolita de ocorrência principalmente em regiões quentes e úmidas do globo e nas áreas mais baixas e por ocasião do cultivo das águas. A doença é favorecida por temperaturas elevadas (28 a 30 °C) e alta umidade, bem como chuvas intermitentes e orvalho abundante (SARTORATO & RAVA, 1994).

Os sintomas do CBCF manifestam-se por toda parte aérea, afetando folhas, caules, vagens e sementes. Na face inferior da folha

aparecem pequenas manchas encharcadas ou úmidas que aumentam gradualmente tornando-se flácidas. Com a evolução da doença as lesões desenvolvem-se e formam extensas áreas necróticas, frequentemente margeadas por uma pequena zona de tecido amarelo-limão, podendo levar a queda das folhas.

As lesões nos caules são deprimidas e têm início com manchas aquosas, que aumentam gradualmente de tamanho. As manchas, posteriormente, tomam a aparência de riscos vermelhos ao longo do caule, podendo rachá-lo e ocasionar acúmulo de exsudato bacteriano na lesão. As vagens infectadas, apresentam lesões circulares, ligeiramente deprimidas e vermelho-escuras, cobertas por incrustações amareladas devido ao exsudato bacteriano dessecado. As manchas estendem-se ao longo do sistema vascular indicando a progressão da bactéria para as sementes (SARTORATO, 2004).

A bactéria pode sobreviver nas sementes no estado hipobiótico por longos períodos (2 a 15 anos), sob condições adversas, bem como em plantas hospedeiras e não hospedeiras como *Vicia sativa*, *V. villosa*, *Vigna umbellata*, *Amaranthus* spp., *Chenopodium album*, *Sida rhombifolia* e outras espécies o gênero *Phaseolus*, e em restos culturais. Possui a capacidade de sobreviver por vários anos tanto na parte interna como na externa da semente, sendo que apenas 0,5% de sementes contaminadas é suficiente para iniciar a disseminação da doença (BIANCHINI et al., 2005; WALLEN & SUTTON, 1965).

A semente é o meio mais eficiente de dispersão da bactéria, pois são as transportadoras do patógeno a longas distâncias e servem como fonte primária de inóculo no campo. Por isso a

importância da utilização de sementes sadias, visto que a maioria das doenças que incidem sobre a cultura do feijoeiro são transmitidas via semente. Desta forma, o nível de tolerância para Xapf, presente no feijão é zero para todas as classes de sementes.

Não existe controle químico eficiente para o CBCF, desta maneira recomenda-se o emprego de medidas de controle, tais como rotação de cultura, rotação varietal e utilização de sementes fiscalizadas livres do patógeno, a fim de minimizar os problemas causados pela ocorrência da doença (CEPEF, 2003).

2.2 Controle da doença

O CBCF é uma doença de difícil controle, em razão do cultivo ser realizado em mais de uma época do ano, da dificuldade de obtenção de cultivares comerciais resistentes e da baixa eficiência do controle químico (VALARINI & MENTEN, 1992).

O tratamento de sementes para o controle de fitobacterioses envolve um conjunto de processos que podem ser biológicos, químicos, mecânicos ou físicos, que visam proteger ou erradicar, externa ou internamente, os patógenos a elas associados (ROMEIRO, 1995).

Recentemente o emprego do controle biológico e de produtos naturais que possam controlar doenças e minimizar os impactos ambientais, tem recebido maior ênfase da comunidade científica.

2.2.1 Controle biológico

O princípio básico do controle biológico está baseado na ação exercida por determinados microrganismos, que eliminam, impedem ou reduzem o desenvolvimento de patógenos transportados pela semente ou presentes no solo. O tratamento biológico é fundamentado na incorporação artificial de agentes de controle biológico às sementes (MENTEN, 1996).

O controle biológico exercido por um ou mais microrganismos, age reduzindo a intensidade de inóculo ou na capacidade de um patógeno incitar doença. Os mecanismos envolvidos são: parasitismo direto, predação, competição por nutrientes e nichos ecológicos, antibiose e produção de substâncias antibióticas e bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos (todos incompatíveis com a vida do patógeno), competição trófica de elementos essenciais ao desenvolvimento do patógeno e pelo estímulo do hospedeiro por microrganismos não necessariamente antagonistas, ativando mecanismos de resistência antagonistas (ROMEIRO, 1995).

Segundo Luz (2005), na cultura do trigo, o controle biológico foi obtido em experimentos realizados em laboratório com a microbiolização, comparado com o controle químico iprodione + tiram, no tratamento de sementes contra os patógenos: *Bipolaris sorokiniana* (incitador da mancha marrom, da podridão comum das raízes e da ponta preta dos grãos), *Pyricularia oryzae* (incitador da brusone), *Drechslera tritici-repentis* (incitador da mancha bronzeada) e *Stagonospora nodorum* (indutor da mancha da gluma). A microbiolização das sementes mostrou uma eficiência superior em

relação ao tratamento com fungicidas sintéticos em cinco experimentos. Avaliando-se a percentagem de fungos nas sementes, em três experimentos, a eficiência foi equivalente e em dois experimentos, o tratamento químico foi superior ao tratamento microbiológico.

O modo de ação do agente biocontrolador deve ser capaz de afetar fases importantes para o patógeno, variando com as interações de cada patossistema (HANDELSMAN & STABB, 1996). No entanto, o modo de ação de alguns agentes de biocontrole são complexos, tornando-se difíceis de serem esclarecidos e reproduzidos em laboratório.

Fungos e bactérias, principalmente actinomicetos, são empregados no controle de fitopatógenos. As bactérias são amplamente estudadas como potenciais agentes de biocontrole, destacando-se os seguintes gêneros e espécies: *Streptomyces* spp., *Erwinia* e *Pantoea*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *Agrobacterium radiobacter* (YUEN et al., 2001; MELO, 1998). Beux & Denardin (2001), em estudo com o uso das bactérias *Bacillus subtilis* e *Actinomicetos* spp. “in vitro”, obtiveram resultados positivos no uso destas como biocontroladores.

Romeiro et al. (1997), isolaram da rizosfera e do rizoplano de plantas sadias de tomateiro, rizobactérias que não exerciam atividade “in vitro” contra *P. syringae* pv. *tomato*. Algumas delas utilizadas na microbiolização por embebição de sementes sadias do hospedeiro, aparentemente induziram resistência a *P. syringae* pv. *tomato*. Em outros estudos, que visavam encontrar rizobactérias com potencialidade para o biocontrole de *Ralstonia solanacearum*, foram isolados

actinomicetos muito promissores, inclusive em ensaios de campo. Alguns promoviam o biocontrole tanto da murcha bacteriana (*R. solanacearum*) em condições de campo como da mancha bacteriana pequena (*P. syringae* pv. *tomato*) em casa de vegetação (ROMEIRO et al., 1997; MOURA et al., 1996).

2.2.1.1 Actinomicetos

Os actinomicetos são bactérias nativas do solo que atuam na decomposição da matéria orgânica, e contribuem para a estruturação do solo através das ligações de suas hifas com partículas do solo. Uma característica importante dos actinomicetos é a produção de antibióticos, cuja função é comprovada em meio de cultura, através da produção de halos de inibição. Neste, é formada a zona livre de crescimento microbiano, em torno da colônia do actinomiceto que sintetiza antibiótico.

De acordo com o CNPMA (2004), muitos benefícios têm sido atribuídos aos microrganismos endofíticos, como a capacidade de alguns em produzir antibióticos e agentes anticancerígenos, além de serem utilizados como agentes de controle biológico de pragas. Assim, o método biológico é uma medida de controle promissora, que deve ser pesquisada, contra os principais patógenos das culturas.

Alguns fungos e bactérias são inibidores de fitopatógenos através da competição por nutrientes, do parasitismo direto e da produção de metabólitos secundários como as enzimas líticas e antibióticos. As espécies de *Streptomyces* são produtoras de antibióticos, enzimas e inibidores enzimáticos, com aplicação em

diferentes áreas entre elas a agricultura. Na área agrícola, alguns metabólitos secundários produzidos pelos actinomicetos estão sendo comercializados como fungicidas (MELO, 1998).

Com o desenvolvimento de populações de patógenos resistentes a produtos químicos, o controle das doenças torna-se cada vez mais difícil e dispendioso tanto para o agricultor como para a indústria agroquímica. Além do uso excessivo de produtos químicos, que provocam danos ao meio ambiente e depauperam a saúde dos produtores e consumidores. Desta maneira, diferentes estratégias podem ser utilizadas para o controle das doenças, dentre estas destacam-se a utilização de agentes de biocontrole, que podem contribuir como um importante componente do manejo integrado.

2.3 Indução de resistência

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos, como resultado apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecer e se proteger, através da montagem de barreiras que restringem a invasão do patógeno.

A resistência natural de plantas à microrganismos patogênicos baseia-se numa grande variedade de barreiras químicas e físicas que promovem os mecanismos de defesa pré-existentes, denominados de constitutivos. Além destes, as plantas possuem mecanismos de defesa eficientes que permanecem inativos ou latentes, que são acionados ou ativados após a célula vegetal entrar em contato com agentes de indução. Nesse caso, a resistência é dita dinâmica, pós-infeccional ou induzida (AGRIOS, 1997; COLSON & DEVERAL, 1996).

O reconhecimento planta-microrganismo ocorre devido à interação de uma molécula elicitora do patógeno ou da própria planta, que é liberada por ação do patógeno, e de um receptor protéico presente na membrana celular da planta (MÉTRAUX, 2001; HAHN, 1996). As moléculas elicitoras são de natureza variável sendo mais comum a ocorrência de carboidratos, lipídios, proteínas e glicoproteínas. A origem também pode ser variável, por exemplo, os lipopolissacarídeos extracelulares de bactérias, glicoproteínas da parede celular de fungos patogênicos e leveduras, e carboidratos da parede celular de fungos não patogênicos, são alguns dos elicitores capazes de ativar mecanismos de defesa de plantas (COVENTRY & DUBERY, 2001; WULFF & PASCHOLATI, 1999; KOCH et al., 1998).

Plantas tratadas com moléculas elicitoras podem levar não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com a indução de resistência. Este fenômeno é caracterizado pela transformação de uma relação compatível entre planta e patógeno, em que ocorre a doença, numa relação incompatível.

A indução de resistência em plantas a patógenos é conhecida há muitos anos. Em 1933, Chester afirmou que as plantas inoculadas com microrganismos atenuados ficavam protegidas contra subseqüentes infecções pelo mesmo microrganismo ou contra outros semelhantes. Entretanto, só recentemente a potencialidade de seu emprego no controle de enfermidades tem recebido enfoque e a dedicação de pesquisadores (FODOR et al., 1998; STICHER et al., 1997).

A resistência sistêmica adquirida – SAR (Systemic Acquired Resistance), designa o fenômeno através do qual as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (STICHER et al., 1997).

A SAR envolve acúmulo de proteínas relacionadas com patogênese (PRPs) como mecanismos induzidos de defesa da planta, e a sua indução pode resultar em alterações visuais (necroses) e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos (VAN LOON et al., 1998).

Segundo Liu et al. (1995), o agente indutor pode ser um ativador químico, extratos de células de microrganismos ou microrganismos vivos. Estes microrganismos nutrem-se de exsudatos radiculares e encontram no rizoplano, nichos ecológicos onde se estabelecem, multiplicam-se, sobrevivem e se protegem da ação antagonística do restante da microflora do solo, exercendo efeito benéfico, promoção de crescimento e controle biológico de enfermidades (ROMEIRO, 1999; KLOEPPER, 1996).

A SAR caracteriza-se por apresentar um mecanismo de controle não específico, ou seja, a capacidade de controlar diversas doenças de origens diferentes (VAN LOON et al., 1998; STICHER et al., 1997). Assim, através da quantificação da atividade de enzimas específicas indicadoras do estado de indução e envolvidas com a defesa é possível evidenciar a forma do mecanismo de resistência (CHEN et al., 2000).

A ativação de genes de defesa que codificam enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa como a peroxidase, β -1,3-glucanase, e envolvidas na síntese de fitoalexinas, levam ao aumento da expressão desses genes que podem resultar na resistência sistêmica induzida (ISR) (NANDAKUMAR et al., 2001).

Recentes estudos estabeleceram novas alternativas para incrementos da resistência das plantas a diversas doenças, principalmente por meio da indução de resistência. Por exemplo, a pré-inoculação com fungo patogênico avirulento pode induzir resistência nas plantas hospedeiras (LYON et al., 1995), bem como a utilização de raios UV (GHAOUTH et al., 2003), altas e baixas temperaturas (GÖKMEN et al., 2005), ondas eletromagnéticas, ferimentos mecânicos (YAHRAUS et al., 1995), estímulos ao estresse (ZHAO et al., 2005), entre outros.

Atualmente, existem poucos produtos no mercado que atuam segundo o princípio de indução de resistência. Na busca de moléculas que possam ser utilizadas em campo, diversos compostos, principalmente de origem microbiana, que possuam a capacidade de estimular uma ou mais respostas de defesa, já foram isolados, caracterizados e descritos como agentes de indução de resistência. Por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de induzir resistência e elicitar respostas de defesa em algumas plantas de pepino (LABANCA, 2002).

2.3.1 Mecanismos bioquímicos envolvidos na indução

A interação planta-patógeno envolve mecanismos bioquímicos onde os genes de alerta são ativados, resultando na síntese de novos compostos e no aumento da atividade enzimática, importantes para a defesa da planta. Além da formação de barreiras estruturais e da produção de compostos tóxicos, que resultam no atraso da infecção.

Em adição aos genes específicos de resistência, as plantas possuem genes que codificam proteínas que estão envolvidas na resposta de defesa da planta contra patógenos. Dessas proteínas relacionadas à patogênese, algumas são enzimas que fazem parte das respostas de defesa natural da planta e algumas acompanham a resposta de hipersensibilidade.

Um arranjo de eventos bioquímicos é observado em células vegetais em poucos minutos após a indução, ocorrendo a ativação da expressão de genes que codificam enzimas da via dos fenilpropanóides, proteínas PR, peroxidases e lipoxigenases. A ativação destes genes é importante para o mecanismo de defesa no local onde a infecção ocorre (MORAES, 1998). Assim, faz-se necessário o estudo da ativação enzimática para melhor compreender o mecanismo de indução de resistência que ocorre nas plantas.

2.3.1.1 Proteínas

Em diversas espécies vegetais a infecção por patógenos é acompanhada pela síntese de várias proteínas, conhecidas como proteínas relacionadas com a patogênese, codificadas pela planta hospedeira. Conforme Sticher et al. (1997), as PRPs são produzidas

por muitas plantas como resposta a infecção por patógenos e participam ativamente no fenômeno de resistência induzida. As PRPs estão estreitamente relacionadas com o fenômeno SAR, às vezes denominadas de SAR-proteínas. A atuação das PRPs no estado de indução de resistência é um pouco desconhecido e necessita de investigações a respeito. Sabe-se que, dependendo da planta e do agente de indução, as proteínas são acumuladas tanto nos espaços intercelulares, que teriam uma ação direta sobre o patógeno, como em vacúolos onde teriam ação após eventos de patogênese que culminam com descompartimentalização.

Os mecanismos moleculares envolvidos na SAR induzida por patógeno, indicam que o início da SAR é acompanhada por aumento local e sistêmico de níveis endógenos de ácido salicílico (MÉTRAUX et al., 1990) e simultaneamente, um aumento da expressão de um grupo enorme de genes incluindo aqueles que traduzem para proteínas PR's (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Diversas proteínas PRs apresentam atividade antimicrobiana, acreditando-se que contribuam com a planta para atingir o estado SAR (CORNÉ et al., 2005).

2.3.1.2 Peroxidases

As peroxidases (PO) são glicoproteínas capazes de catalisar diversas reações, como a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de H_2O_2 é importante nas reações de defesa da planta, pois age como sinalizador para outras respostas de defesa, participam de reações catalizadas por peroxidases, que resultam na polimerização de

fenóis e na formação de lignina, formação de ligações cruzadas de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e a sua incorporação à parede celular. Conseqüentemente levam ao fortalecimento da parede celular, e a toxidez direta sobre patógenos (ZHAO et al., 2005; LABANCA, 2002; MAUCH-MANI & MÉTRAUX, 1998).

A geração de H_2O_2 e de espécies ativas de oxigênio (EAOs), ocorre normalmente no metabolismo das células vegetais. No entanto, podem ser potencializados frente a estresse de diferentes origens. Algumas enzimas como a peroxidase, catalase e superóxido dismutase, atuam sobre as EAOs, livrando a célula do seu efeito deletério. A atividade destas enzimas é aumentada não só quando as plantas sofrem injúrias por patógenos, mas também quando são expostas a outros tipos de estresse (LABANCA, 2002).

A peroxidase é uma importante enzima presente em plantas e está envolvida em diversas reações, como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético (IAA), oxidação de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos e regulação da alongação de células (CAMPOS et al., 2004; KAO, 2003). Também estão envolvidas na resposta de hipersensibilidade (HR), síntese de lignina e suberina para o espessamento da parede celular por adição de compostos fenólicos (QUIROGA et al., 2000; MARTINEZ et al., 1998).

O processo de invasão do patógeno na parede celular da planta inclui dois cursos: (1) degradação enzimática da parede celular da planta pela secreção química do patógeno; (2) um enorme e contínuo estímulo físico de pressão na parede celular (ZHAO et al., 2005). Esse estímulo produz sinal mecânico, que pode desencadear

resposta de defesa, ocorrendo a produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio e transcrição de genes relacionados à defesa.

2.3.1.3 β -1,3-glucanases

As β -1,3-glucanases são capazes de desencadear os mecanismos de defesa da planta e agir diretamente sobre o patógeno (VAN LOON et al., 1994). Esta enzima também é importante por atuar em diversos processos fisiológicos das plantas, como a germinação de sementes, desenvolvimento de pólen, resposta de estresses, florescimento e mobilização de moléculas de reserva (MOROHASHI & MATSUSHIMA, 2000).

Vários fatores de estresse como a infecção por bactérias, vírus, fungos patogênicos e a alimentação de insetos causam a indução na atividade de β -1,3-glucanases e de quitinase, sugerindo que essas enzimas apresentam função defensiva nas plantas (KEMP et al., 1999).

A presença de ferimentos nas plantas causa a deposição de β -1,3-glucano, na parede celular na forma de caloses, que podem ser proveniente dos mecanismos de proteção, conseqüentemente, parte do ferimento é fechado ou limitado e a invasão do patógeno é restringida (MOROHASHI & MATSUSHIMA, 2000).

2.3.1.4 Fenilalanina amônia-liase

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários chamados de compostos fenólicos, que agem como

compostos de defesa contra patógenos, suporte mecânico e proteção contra radiação UV. A classe mais abundante de compostos fenólicos é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. Esta reação é catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) (Figura 1). A invasão de patógenos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica PAL, aumentando a quantidade desta enzima na planta e estimulando a síntese de compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A via de biossíntese dos fenilpropanóides sintetiza uma variedade de compostos fenólicos como os flavonóides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzóico. Estes compostos atuam em diversas funções das plantas, como antioxidantes, agentes antimicrobianos, pigmentos coloridos e polímeros, suberinas e ligninas como constituintes estruturais (SARMA et al., 1998).

A PAL é uma enzima chave da via metabólica da fenilalanina. Além de fazer parte da classe de enzimas envolvidas com a formação de lignina, cujo acúmulo na parede celular é concomitante com o aumento na atividade de PAL, induzida por agente biótico ou abiótico (ZHAO et al., 2005).

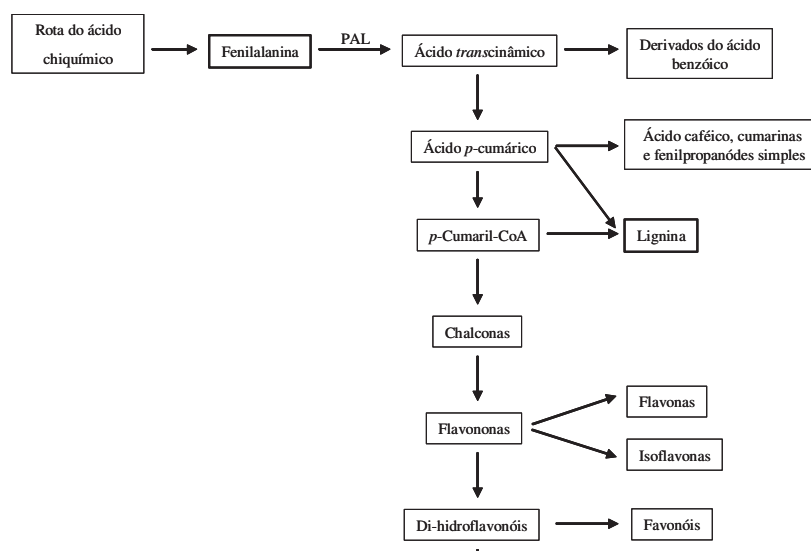


Figura 1 - Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da rota do ácido chiquímico, iniciado pela fenilalanina (adaptado de TAIZ & ZEIGER, 2004).

Segundo Ryals et al. (1996), o ácido salicílico (AS) é importante na resistência à doenças, pois a rota de biossíntese do AS pode representar o principal ponto no controle das respostas de defesa da planta. A rota biossintética do AS apresenta seu início com a conversão da fenilalanina a ácido transcinâmico (*t*-CA), sendo catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). O *t*-CA é convertido em AS, este produto do metabolismo de fenilpropanóides, pode ter papel fundamental na transmissão de sinais para ativar a SAR (SILVA, 2002; MORAES, 1998).

2.3.1.5 Polifenoloxidasas

As polifenoloxidasas oxidam um amplo grupo de fenóis sem a necessidade de H₂O₂, também estão envolvidas na rota

biossintética dos fenilpropanóides. Possuem a capacidade de produzir quinonas, por meio da oxidação de fenóis (LI & STEFFENS, 2002; DUANGMAL & APENTEN, 1999).

A atividade da polifenoloxidase pode ser acrescida ou inibida em algumas plantas por estresses como injúria, toxicidade de nitrogênio e ataque de patógenos (SÁNCHEZ et al., 2000). Em geral, a polifenoloxidase é elevada em tecidos infectados e apresenta grande importância para as plantas, pois está envolvida nos mecanismos de defesa e na senescência (AGRIOS, 1997).

No local onde ocorre a descompartimentação, provocada pelo patógeno, bem como nas células próximas a região de infecção, as peroxidases e polifenoloxidases atuam na degradação oxidativa de compostos fenólicos. Geralmente com o aparecimento de substâncias escuras proveniente da polimerização oxidativa das quinonas (CAMPOS et al., 2004; BINDSCHEDLER et al., 2002).

Os compostos produzidos pela planta, durante o processo infeccioso e todo o desenvolvimento da doença, são importantes para desencadear mecanismos de resistência contra o organismo invasor.

2.3.1.6 Isoperoxidasas

Técnicas bioquímicas e moleculares baseadas no polimorfismo de enzimas e fragmentos de DNA possibilitam uma rápida detecção de marcadores genéticos, que podem ser utilizados como ferramentas para o melhoramento genético (BRAMMER, 2000), e também para o controle de doenças através de indutores de resistência.

As isoenzimas merecem destaque, por serem controladas por um ou vários genes, situados num mesmo loco ou em locos diferentes, respectivamente (BRAMMER et al., 2002).

As atividades isoenzimáticas são utilizadas em estudos de estresse biótico ou abiótico, por estarem relacionadas com as mudanças metabólicas e mecanismos de defesa que ocorrem em plantas. Pelo fato dos polimorfismos enzimáticos estarem mais perto da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA e por serem o produto intermediário da expressão do gene (TORGGLER et al., 1995).

Estas enzimas agem como armas químicas de defesa contra o ataque de patógenos, além de algumas catalizarem a formação de barreiras físicas na planta. Sabe-se que os compostos produzidos pela planta, durante o processo da doença, têm papel fundamental na resistência ao organismo invasor. Por isso faz-se necessário aplicar diversas técnicas nas mais variadas culturas, para melhor compreender os mecanismos envolvidos com a defesa contra o patógeno (BINDSCHEDLER et al., 2002).

Segundo Scandalios (1979), a visualização dos dados enzimáticos leva a informação básica de que diferenças na mobilidade de isoenzimas, em um campo elétrico, são resultantes das seqüências de DNA que codificam essas enzimas. Em virtude das propriedades catalíticas das enzimas, as isoenzimas, especialmente podem refletir o estado metabólico e diferenciado das células.

As enzimas apresentam um amplo espectro de funções e é compatível com a presença de várias isoformas, sugerindo que diferentes isoenzimas de peroxidase possivelmente estão envolvidas

em processos distintos (CARUSO et al., 2001). Além disso, as peroxidases podem ser consideradas marcadores úteis de estresse, pois sua atividade é afetada pela temperatura, poluição do ar, metais pesados, salinidade, radiação UV e ataque de patógenos.

A ativação das formas latentes de peroxidase, após a destruição ou inativação de inibidores protéicos ou fenólicos, pode conduzir à indução de síntese de isoformas de peroxidase (BIRECKA et al., 1973).

Com a falta de alternativas para o controle de doenças, principalmente as de etiologia bacteriana, o uso do controle biológico com organismos vivos como *Actinomicetos* sp., estirpes de *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas fluorescens* e de, possivelmente, outros organismos, passam a ser considerados como caminhos alternativos para o controle de doenças.

Partindo do princípio que existem moléculas elicitoras na parede celular de *Actinomicetos* spp., capazes de produzir respostas de defesa em feijoeiro e subsequente indução de resistência, e se esta pode estar envolvida como mecanismo de controle exercido pelo biocontrolador, determinou-se a atividade de quatro enzimas e uma isoenzima, indicadoras do estado de indução de resistência em plantas de feijoeiro.

CAPÍTULO I

CONTROLE BIOLÓGICO DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO POR ELICITOR BIOLÓGICO

**CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO³, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN⁴**

RESUMO - O feijoeiro comum é uma planta bastante vulnerável a ação de agentes de natureza biótica, que causam grandes danos à cultura. O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF), incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), é a principal doença bacteriana do feijoeiro, podendo causar danos de até 30%. Objetivou-se avaliar o potencial de controle biológico de CBCF, através do tratamento de sementes e da parte aérea da planta com biocontrolador, as sementes da Cultivar BRS Valente foram submetidas a inoculação com o patógeno, microbiolização com biocontrolador e aplicação na parte aérea, como estratégias para o controle da doença. As plantas foram avaliadas quanto ao poder de germinação, incidência e severidade do CBCF e possível controle de fungos associados à semente. As sementes tratadas com biocontrolador apresentam maior poder de germinação e menor percentagem de fungos. Nas comparações da incidência e da severidade ao longo do ciclo da cultura, constataram-se diferenças significativas entre os tratamentos. As plantas oriundas das sementes microbiolizadas apresentaram redução da área abaixo da curva de progresso da doença, sugerindo-se que o biocontrolador tem efeito sobre o CBCF.

³ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

⁴ Orientadora, Bióloga, Dra., professora da FAMV/UPF, norimar@upf.br.

Palavras-chave: Feijão, Xanthomonas, microbiolização, severidade.

BIOLOGICAL CONTROL OF THE COMMON BACTERIAL BLIGHT OF BEANS BY ELICITOR BIOLOGICAL

ABSTRACT - The common bean is a sufficiently vulnerable plant the action of nature agents bioptics, who cause severe damages to the crop. The common bacterial blight of beans (CBCF), caused for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), is the main bacterial disease of the bean, being able to cause damages of to 30%. The goal of this research was to evaluate the potential of biological control of CBCF, through the treatment of seeds and of above-ground plant parts with biocontroller. The seeds of Cultivar BRS Valente had been submitted the inoculation with the pathogen, microbiolized with biocontroller and application of above-ground plant parts, as strategies for the control of the disease. The plants have been evaluated how much to the power of germination, incidence and severity of the CBCF and possible control of fungi associates to the seed. The seeds treated with biocontroller to showed major to be able of germination and minor percentage of fungi. In the comparisons of the incidence and severity to the cycle dates of the crop, significant differences among the treatments had been evidenced. The deriving plants of the microbiolized seeds had showed reduction of the area below of the curve of progress of the disease, having suggested themselves that the biocontroller has effect on the CBCF.

Key words: Bean, *Xanthomonas*, microbiolization, severity.

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, a ocorrência de doenças em plantas é uma exceção, e não uma regra. A maioria das associações entre plantas e microrganismos tem como resultado uma interação incompatível, não havendo o desenvolvimento da doença. Para ocorrência da doença é necessário que haja uma planta suscetível, um patógeno virulento e um ambiente favorável (AGRIOS, 1997). No contato planta-microrganismo, o primeiro evento que ocorre é o reconhecimento do possível patógeno pela planta e subsequente ativação de mecanismos de defesa contra o invasor.

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (VAUTERIN et al., 1995), é uma doença de difícil controle agravada pelo fato do patógeno ser transmitido via semente, potencializando os danos na cultura. A contaminação externa das sementes desempenha papel fundamental na disseminação do patógeno, a presença de no mínimo de 10^3 a 10^4 bactérias na superfície de cada semente é o suficiente para o surgimento de plantas infectadas em condições de campo (RAVA, 1988).

Diferentes estratégias podem ser utilizadas para o controle das doenças, tais como a utilização de agentes de biocontrole com ação de controle biológico e indução de resistência, são alvo de intensos estudos atualmente (LABANCA, 2002; NANDAKUMAR et

al., 2001; CHEN et al., 2000), além de contribuir como um importante componente do manejo integrado.

Segundo Halfeld-Vieira (2002), as bactérias são relatadas como agentes de biocontrole capazes de atuar através dos mais diversos mecanismos como por exemplo, a antibiose, o parasitismo, a competição e a indução de resistência, e são os organismos mais estudados para o controle biológico. Beux & Denardin (2001), realizaram estudos com o uso das bactérias *Bacillus subtilis* e *Actinomicetos* spp. “in vitro”, onde obtiveram resultados positivos no uso dessas bactérias como biocontroladores. Agostini (2004) evidenciou a redução do crestamento bacteriano comum do feijoeiro ao longo do ciclo da cultura, com a aplicação de biocontrolador contendo actinomicetos.

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial de controle biológico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, através do tratamento de sementes e da parte aérea da planta com biocontrolador.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitobacteriologia e casa-de-vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, RS, no período de setembro de 2004 a julho de 2005. As sementes utilizadas foram oriundas de lavouras de produção de sementes da Região Norte do Estado do Rio Grande do Sul, safra 2003/2004, Cultivar BRS Valente. A escolha da Cultivar BRS Valente foi devido a melhor

produtividade, com cerca de 215 g o peso de 1000 sementes, além de estar entre as cultivares registradas de feijão preto, indicadas para o cultivo no Rio Grande do Sul na safra 2003/2004.

2.1 Extração e quantificação de Xapf em sementes

2.1.1 Preparo das amostras

As sementes de feijão comum da Cultivar BRS Valente, foram submetidas à desinfestação superficial, mediante imersão em álcool 70° GL, por 2 minutos, em seguida imersas em solução de hipoclorito de sódio à 1%, por dois minutos e lavadas por três vezes sucessivas com água destilada e esterilizada. Para a técnica de extração foram tomadas quatro amostras de 1000 sementes, cada amostra foi dividida em quatro subamostras de 250 sementes. Cada subamostra foi transferida para erlenmeyer esterilizado e imersas em 500 mL de solução fisiológica 0,85% estéril. As amostras foram incubadas sob agitação orbital a 120 rpm por 12 horas, com temperatura constante de 4 °C.

2.1.2 Extração de Xapf das sementes

As amostras incubadas por 12 h foram levadas à câmara de fluxo laminar e toda suspensão obtida foi distribuída em tubos de

centrífuga esterilizados. As subamostras foram centrifugadas a 4.000 rpm (2.475 g), por 30 minutos, após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o “pellet” foi ressuspendido com 3 mL de solução fisiológica 0,85% estéril. Para cada subamostra foram aplicados quatro fatores de diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), com três repetições. Após efetuou-se diluições sucessivas, semeando-se uma alíquota de 200 μ l em placas de Petri com meio de cultura Peptona-Tirosina-Amido-Ágar - PTSA (VAN VUURDE et al., 1983), pela técnica do espalhamento na superfície do meio de cultura. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 °C, durante 48 h.

2.1.3 Quantificação de Xapf em sementes

A quantificação das unidades formadoras de colônia (UFCs), foi processada a partir do cálculo: fator de diluição x volume da alíquota (mL) x número de UFCs crescidas na placa de Petri. As sementes avaliadas quanto à qualidade fitossanitária, apresentaram 5×10^4 UFCs g^{-1} de semente indicando a presença natural de Xapf na Cultivar BRS Valente.

2.2 Inoculação artificial de sementes com Xapf

2.2.1 Preparo do inóculo de Xapf

O inóculo utilizado foi o isolado 1190-95 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), proveniente da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico, Estação experimental de Campinas. O preparo do inóculo foi realizado a partir de colônias puras de Xapf cultivadas em meio de cultura 523 (KADO & HESKETT, 1970), por 24 h e ressuspendidas em 3 mL de solução fisiológica. A suspensão foi acrescentada em 50 mL de meio de cultura líquido 523, sob agitação orbital constante a 28 °C. Após 24 h de incubação, procederam-se diluições sucessivas e semeadura em meio de cultura PTSA, para determinação da concentração de células, obtendo-se $1,2 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹.

2.2.2 Inoculação das sementes

A inoculação consistiu na adição de 3,5 mL da suspensão de Xapf, com concentração celular de $1,2 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹, sobre 500 g de sementes, acondicionadas em sacos plásticos, os quais foram fechados e agitados suavemente, de modo que todas as sementes estivessem cobertas pela suspensão. As sementes foram mantidas em repouso em ambiente asséptico durante 24 h para a secagem e aderência do inóculo.

Após a inoculação artificial das sementes com Xapf, foram retiradas aleatoriamente dez sementes. Cada semente foi transferida para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução fisiológica, totalizando dez tubos, os quais foram agitados em vortex por dez segundos. A seguir, retirou-se uma alíquota de 200 µl da suspensão, semeando-se em três repetições em placas de Petri com meio de

cultura PTSA. As placas foram incubadas à 28 °C por 24 h e realizada a contagem das UFCs por semente. O valor obtido foi de $4,2 \times 10^3$ UFCs semente⁻¹ de Xapf.

2.3 Microbiolização das sementes com biocontrolador

O isolado de *Actinomiceto* spp. (014) utilizado para o preparo do biocontrolador, foi cedido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), proveniente da coleção de bactérias do Laboratório de Bacteriologia Vegetal.

2.3.1 Preparo do biocontrolador

O isolado de actinomiceto foi veiculado a uma formulação à base de polímero contendo 1 g de goma xantana, 1,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) e 100 mL de água destilada. A formulação foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos, constituindo a formulação (DENARDIN & FREIRE, 2000).

Colônias puras de actinomiceto crescidas em meio de cultura 523 por 24 h, foram ressuspensas em 3 mL de solução fisiológica e transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura líquido 523, mantido sob agitação orbital por 48 h à 28 °C. Após 48 h, procedeu-se a quantificação de células de actinomiceto na suspensão por método de diluição sucessiva e semeadura de 200 µl em meio de cultura 523, obtendo-se $2,8 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de actinomiceto. Dessa suspensão, transferiu-se 5 mL para um frasco contendo 20 mL do veículo preparado e esterilizado previamente, constituindo o

biocontrolador. A concentração de células de actinomicetos no biocontrolador foi determinada pela técnica de diluição sucessiva, seguida de semeadura de 200 µl em meio de cultura 523 e incubação por 48 h, obtendo-se $1,6 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de actinomiceto.

2.3.2 Microbiolização das sementes

A microbiolização das sementes constituiu da adição de 3,5 mL do biocontrolador sobre 500 g de sementes, acondicionadas em sacos plásticos. Para a completa microbiolização os sacos foram fechados e agitados suavemente por 10 minutos, a seguir, foram mantidos em ambiente limpo durante 3 h. O número de células de actinomiceto presentes nas sementes foi determinado após esse período, tomando-se aleatoriamente dez sementes. Cada semente foi transferida para tubos de ensaio contendo 1 mL de solução fisiológica, totalizando dez tubos, agitados em vortex. A seguir, retirou-se uma alíquota de 200 µl da suspensão, semeando-se três repetições em placas de Petri com meio de cultura 523 e incubadas à 28 °C por 48 h. Realizou-se a contagem das UFCs por semente, obtendo-se $2,6 \times 10^3$ UFCs semente⁻¹ de actinomicetos.

2.4 Experimentos

2.4.1 Experimento I

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural de 5×10^4 UFCs g^{-1} de Xapf.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural mais a inoculação com Xapf.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural mais a inoculação com Xapf, mais a microbiolização com biocontrolador.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural mais microbiolização com biocontrolador.

2.4.2 Experimento II

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural com Xapf mais aspersão foliar com água.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural com Xapf mais uma aplicação foliar com biocontrolador, aos 35 dias após a semeadura.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural com Xapf mais duas aplicações foliares com biocontrolador, aos 35 e 50 dias após a semeadura.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural com Xapf mais três aplicações foliares com biocontrolador, aos 35, 50 e 65 dias após a semeadura.

2.5 Instalação dos experimentos em casa-de-vegetação

Para a instalação dos experimentos em casa-de-vegetação, foram proporcionadas condições artificiais de ambiente

para favorecer o desenvolvimento de CBCF. As sementes foram semeadas em vasos preenchidos com 3 kg de solo, Latossolo Vermelho distrófico típico, unidade de mapeamento Passo Fundo, com 65% de argila pertencente à Classe 1, corrigido o pH e fertilidade do mesmo de acordo com as recomendações de adubação indicadas pela CEPEF (2003), e aplicação de uréia na superfície no estágio V3 de desenvolvimento das plantas.

Cada tratamento foi representado por dez vasos com cinco plantas cada, ou seja, dez repetições, totalizando 50 plantas por tratamento em cada experimento realizado. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado para os dois experimentos.

2.6 Aplicação do biocontrolador na parte aérea da planta

O preparo do biocontrolador foi o mesmo utilizado para a microbiolização das sementes. Da suspensão contendo $2,8 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹, tomou-se 10 mL acrescentado em 20 mL do veículo e agitado para uma completa uniformização. A quantificação das células de actinomiceto que constituíam o biocontrolador foram obtidas por diluição sucessiva e semeadura em meio de cultura 523, resultando em $1,7 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹. Diluiu-se 25 mL do biocontrolador em 400 mL de água destilada e esterilizada. A concentração de actinomiceto para aplicação foliar após a diluição do biocontrolador em água foi de $2,2 \times 10^7$ UFCs mL⁻¹.

O biocontrolador foi aplicado por aspersão em toda parte aérea das plantas até o ponto de escorrimento, em intervalos de 15 dias

conforme cada tratamento do experimento II. O controle foi aspergido com água destilada esterilizada, para simular as mesmas condições.

2.7 Teste de germinação das sementes

No teste de germinação foram utilizadas as sementes dos tratamentos do experimento I, após 5 h do processo de microbiolização. Foram utilizadas 400 sementes de cada tratamento distribuídas em 16 'gerbox' com 25 sementes cada, em meio de cultura BSA. As sementes foram colocadas em câmara de crescimento à 20 °C, 12 h luz por 7 dias, para a observação da presença de fungo. Após este período procedeu-se a contagem de sementes com a presença de fungos e bactérias e aos 14 dias, a contagem de sementes germinadas para cada tratamento.

2.8 Avaliação da evolução do CBCF

As avaliações do CBCF prosseguiram a cada dez dias através da avaliação da incidência definida como número de folhas que apresentam sintomas e pela severidade (%), definida como a percentagem da área foliar com sintomas. Todas as plantas de cada tratamento foram avaliadas, não constituindo amostras destrutivas. As avaliações iniciaram assim que apareceram os primeiros sintomas de CBCF nas folhas. Utilizou-se a escala diagramática de Azevedo (1998), para as comparações da percentagem da área foliar afetada. Após a tabulação dos dados a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada.

2.9 Quantificação da população bacteriana e de actinomicetos no solo após o cultivo

Após o cultivo do feijoeiro em casa-de-vegetação, as plantas foram eliminadas, mantendo-se o solo. De cada tratamento foram tomadas 500 g de solo compostas por 100 g de cinco vasos escolhidos ao acaso, armazenadas em sacos plásticos. Procedeu-se a homogeneização das amostras, retirando 50 g de peso seco de solo, adicionado em 150 mL de água destilada esterilizada. A mistura foi agitada por 15 minutos a 80 rpm sob agitação orbital e após procedeu-se a leitura do pH de cada amostra. Para a quantificação da população bacteriana e de actinomicetos, 1 mL de cada amostra foi retirado e realizou-se diluições sucessivas com sementeira de 200 µl em dois meios de cultura, 523 e Caseino-dextrose-ágar (CDA), com três repetições cada. Amostras do mesmo solo sem o plantio da cultura, que permaneceram em vasos no mesmo local, foram utilizadas como controle (T0). A contagem das UFCs de bactérias realizou-se em meio de cultura 523 após 24 e 48 h da sementeira e as UFCs de actinomicetos em CDA após 48 e 72 h. A identificação das bactérias encontradas no solo não foi realizada neste trabalho.

2.10 Análise dos resultados

Os dados das avaliações da germinação, incidência, severidade, AACPD e da quantificação de bactérias e actinomicetos no solo, foram submetidos a análise estatística, realizada através do

programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC), versão 8.0, utilizando o procedimento General Linear Model e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de Xapf nas sementes, indicaram a presença de 5×10^4 UFCs g^{-1} de semente, como infecção natural da semente. Portanto, as sementes utilizadas para os tratamentos apresentavam uma quantidade significativa de Xapf, que possibilita o desenvolvimento da doença. As sementes dos tratamentos 2 e 3 inoculadas com uma suspensão contendo $1,2 \times 10^8$ UFCs mL^{-1} de Xapf apresentaram $4,2 \times 10^3$ UFCs de Xapf por semente. Assim, a quantidade de bactéria infestando e infectando a semente é suficiente para desencadear a doença. Weller & Saettler (1980), demonstraram que a população mínima de 10^3 e 10^4 UFCs de Xap por semente foi suficiente para originar plantas doentes em condições de campo.

As sementes dos tratamentos 3 e 4 submetidas à microbiolização com biocontrolador, apresentaram $2,6 \times 10^3$ UFCs semente⁻¹ de actinomiceto na superfície da semente.

No experimento I, o teste de germinação dos tratamentos apresentou diferenças significativas na germinação das sementes, na presença de bactérias e na quantidade de fungos por sementes, conforme Tabela 1.

Os fungos encontrados nas sementes pertenciam aos gêneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

Tabela 1 – Percentagem de germinação das sementes de feijoeiro submetidas a quatro tratamentos e percentagem de sementes com bactérias e fungos

Tratamentos*	% de sementes germinadas	% de sementes com	
		Bactéria	Fungo
T 1	77 b	10 b	20 a
T 2	60 c	16 a	21 a
T 3	73 b	11 b	13 b
T 4	82 a	6 c	10 c
Média	73	11	16
CV (%)	2,36	11,84	6,12

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tratamento 4 apresentou maior percentagem de sementes germinadas e menor percentagem de sementes com bactéria e com fungo, comparado com os demais tratamentos. Estes resultados sugerem que o biocontrolador, reduz a quantidade de fungos e bactérias na semente e conseqüentemente possibilita uma percentagem maior de sementes germinadas.

Segundo Luz (2005), na cultura do trigo, o controle biológico foi obtido em experimentos realizados em laboratório com a microbiolização no tratamento de sementes contra os patógenos: *Bipolaris sorokiniana*, *Pyricularia oryzae*, *Drechslera tritici-repentis*

e *Stagonospora nodorum*. O autor concluiu que a microbiolização das sementes mostrou uma eficiência superior em relação ao tratamento com fungicidas sintéticos. Concordando com os resultados obtidos com o controle de patógenos nas sementes de feijoeiro microbilizadas com o biocontrolador no presente trabalho.

O tratamento 3 apresentou percentagem de germinação semelhante ao controle (T1), no entanto, obteve-se menor percentagem de sementes com fungos, indicando que o tratamento de sementes com o biocontrolador, mesmo em situações com alta infecção de Xapf, reduz o percentual de fungos associados à semente. No tratamento 2 observou-se expressiva redução da percentagem de sementes germinadas. Conforme Valarini & Menten (1991), as sementes de feijoeiro severamente atacadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, apresentam taxas reduzidas de germinação além de produzir plântulas deformadas.

As avaliações da incidência do CBCF demonstraram poucas diferenças entre os tratamentos na análise estatística com Teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Incidência (%) do cretamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) nas folhas de plantas submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador

Tratamento*	Incidência (%)					
	Dias após a semeadura					
	32	42	52	62	72	82
T 1	2,40 ab	1,75 ab	2,39 ab	4,68 a	6,86 ab	6,98 ab
T 2	4,40 a	3,75 a	3,08 a	4,19 a	7,85 a	7,79 a
T 3	3,20 ab	3,00 ab	3,49 a	4,05 a	4,72 b	6,38 ab
T 4	0,40 b	0,75 b	1,08 b	3,08 a	4,59 b	6,14 b
Média	2,60	2,31	2,51	4,00	6,00	6,82
CV (%)	119,71	88,81	64,82	44,32	34,56	17,73

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nas plantas oriundas de sementes tratadas com o biocontrolador (T4), observou-se uma tendência de apresentar uma menor incidência da doença nas folhas em todos os dias avaliados, comparadas com as plantas dos demais tratamentos. O tratamento 2 apresentou a maior incidência, no entanto, no tratamento 3 onde as plantas foram inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com o biocontrolador, mostrou-se semelhante ao tratamento 2 até aos 62 dias. Aos 72 dias os tratamentos 1 e 2 apresentaram aumento significativo da incidência, indicando que nos tratamentos com biocontrolador o aumento da incidência é gradual e lento. Sugere-se que esteja ocorrendo um possível controle da doença, pelo fato do biocontrolador agir como indutor biológico de resistência.

Em concordância com os resultados obtidos por Nandakumar et al. (2001), na investigação dos mecanismos envolvidos no controle biológico com *Pseudomonas fluorescens*, os

autores concluíram que diferentes estirpes da bactéria protegem a planta de vários patógenos em diversas culturas por levar à resistência sistêmica induzida.

Em relação á severidade do CBCF, observou-se diferenças significativas estatisticamente nos dias 32 e 82, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Severidade (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador

Tratamento*	Severidade (%)						AACPD
	Dias após a semeadura						
	32	42	52	62	72	82	
T 1	0,30 ab	0,80 a	3,00 a	7,90 a	7,80 a	39,50 a	497,00 a
T 2	0,95 a	1,70 a	4,50 a	5,70 a	8,20 a	43,00 a	586,85 a
T 3	0,65 ab	1,80 a	2,50 a	3,90 a	5,10 a	19,50 b	262,90 b
T 4	0,10 b	0,60 a	1,50 a	4,20 a	5,60 a	15,00 b	220,10 b
Média	0,50	1,22	2,87	5,42	6,67	29,25	391,71
CV (%)	111,8	124,47	105,22	104,25	85,35	32,25	42,89

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 32 dias, o tratamento 4 apresentou menor severidade, comparadas com os demais tratamentos, este resultado é esperado, uma vez que os tratamentos 2 e 3 apresentam maior quantidade de Xapf nas sementes capaz de causar um ataque mais severo da doença desde os primeiros estádios de desenvolvimento da planta. E os

tratamentos 1 e 4 apresentam infecção natural, mas em quantidade suficiente para causar a doença.

Com uma quantidade menor de inoculo inicial do patógeno pode-se observar que o tratamento 4 apresentou menor evolução da doença, demonstrando que a aplicação do biocontrolador na semente reduz a severidade da doença nos primeiros estádios de desenvolvimento da doença.

Aos 82 dias os tratamentos 1 e 2 apresentaram uma “explosão” da doença, devido ao fato das plantas estarem mais vulneráveis a ataques severos da doença, pois neste período iniciou-se a floração. Entende-se que a planta concentra todas as energias para a formação das vagens e das sementes, tornando-se suscetível a doenças. Nos tratamentos 3 e 4, observou-se uma tendência de menores AACPD, sugerindo que o biocontrolador controla o CBCF, diminuindo a área foliar com sintomas e a evolução da doença, mesmo quando as sementes estão altamente infectadas com o patógeno.

Dalisay & Kuc (1995) observaram uma redução de 96-99% da área necrótica nas folhas de plantas de pepino induzidas com *Colletotrichum lagenarium*, comparadas com as folhas das plantas controle quando foram desafiadas com o patógenos sete dias após a indução. Os autores concluíram que a indução de resistência sistêmica em plantas de pepino contra *C. lagenarium*, tem sido relatada por promover o atraso no aparecimento dos sintomas, redução no número e tamanho das lesões e redução da área necrótica total. Concordando com os resultados obtidos em relação a AACPD deste trabalho.

Raízes de *Arabidopsis* colonizadas com estirpe de *Pseudomonas fluorescens*, conferiram proteção à planta contra

diferentes agentes patogênicos, incluindo bactérias foliares como *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*, fungos foliares e radiculares. A proteção contra os patógenos é manifestada pela redução dos sintomas da doença e pela inibição do crescimento dos mesmos (CORNÉ et al., 2005; TON et al., 2002). Estes resultados corroboram com os observados neste trabalho.

No experimento II, a incidência do CBCF nas plantas não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos, conforme Tabela 4. A severidade do CBCF não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos com a aplicação foliar do biocontrolador, conforme Tabela 5.

A incidência e a severidade do tratamento 3 apresentaram-se menor até os 82 e 72 dias após a semeadura, respectivamente. Sugerindo que o biocontrolador aplicado na parte aérea da planta reduz a evolução da doença e conseqüentemente a AACPD, comparado com os tratamentos em que foi realizada apenas uma aplicação do biocontrolador e com o controle.

Concordando com os estudos realizados por Nandakumar et al. (2001), com a aplicação de estirpes de *Pseudomonas* em plantas, na forma de cultura de suspensão ou em formulação, os autores observaram redução na severidade da doença e promoveram o crescimento da planta tanto em experimentos realizados em casa-de-vegetação como em condições de campo. As plantas tratadas apresentaram lesões menores do que as plantas não tratadas com a formulação.

Tabela 4 – Incidência (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) nas folhas de plantas submetidas a aplicação foliar com biocontrolador

Tratamento*	Incidência (%)					
	Dias após a semeadura					
	32	42	52	62	72	82
T 1	0,80 a	1,50 a	1,44 a	2,71 a	4,15 a	7,10 a
T 2	0,80 a	1,25 a	1,64 a	3,09 a	5,44 a	7,10 a
T 3	0,80 a	0,25 a	1,45 a	2,55 a	3,58 a	6,39 a
T 4	0,00 a	1,65 a	2,18 a	2,92 a	3,36 a	7,10 a
Média	0,60	1,16	1,68	2,82	4,13	6,92
CV (%)	329,6	182,63	117,03	74,67	55,98	16,21

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram observados por Wright & Beer (2005), com pulverizações de flores de pêra, maçã e de espinheiro branco, com suspensões de *Pantoea agglomerans*, 24 horas antes ou simultaneamente com suspensões de *Erwinia amylovora*, reduziram a quantidade e o desenvolvimento de sintomas de “fogo bacteriano”.

Tabela 5 – Severidade (%) do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF) e área abaixo da curva de progresso da

doença (AACPD) nas plantas submetidas à aplicação foliar com biocontrolador

Tratamento*	Severidade (%)						AACPD
	Dias após a semeadura						
	32	42	52	62	72	82	
T 1	0,10 a	0,40 a	2,70 a	7,10 a	8,70 a	21,50 a	341,15 a
T 2	0,20 a	0,80 a	2,90 a	6,50 ab	9,20 a	19,50 a	334,80 a
T 3	0,00 a	0,20 a	1,50 a	1,60 b	6,60 a	20,50 a	227,65 a
T 4	0,10 a	1,10 a	2,50 a	4,20 ab	6,10 a	21,50 a	293,55 a
Média	0,10	0,62	2,40	4,85	7,65	20,75	299,29
CV (%)	307,31	220,70	119,07	87,30	69,13	52,97	39,00

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diversas doenças fúngicas e bacterianas de várias culturas estão sendo controladas em caráter experimental pela bactéria *P. agglomerans*. Plantas de cevada foram protegidas contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* quando tratadas com *P. agglomerans*, bem como plantas de feijão, trigo e tomate protegidas contra diversos patógenos (JOHANSSON et al., 2003; YUEN et al., 2001; SUJKOWSKI et al., 1994).

Métodos biológicos de controle de doenças são empregados em diversas culturas para diferentes doenças. Na Alemanha, o emprego do fungo *Verticillium lecanii* apresentou 68% de controle da ferrugem do feijoeiro em condições de campo. A bactéria *Bacillus subtilis* foi responsável por 75% de controle da mesma doença, quando aplicado em três pulverizações

(SARTORATO et al., 1996). Estes estudos demonstram o emprego de microrganismos antagonistas de ampla adaptabilidade que possibilitam o seu uso no controle de patógenos, como o microrganismo (Actinomiceto) empregado neste trabalho para o controle biológico de Xapf.

Nandakumar et al. (2001), observaram que a aplicação combinada de uma estirpe de *Pseudomonas*, nas sementes, nas raízes, no solo e aplicação foliar, resultou numa significativa redução no desenvolvimento da doença em plantas de arroz, causada por *Rhizoctonia solani*, comparado com as aplicações individuais. Assim, sugere-se que para melhor eficácia no controle do CBCF, estudos posteriores com a combinação de aplicações do biocontrolador, seriam de grande valia para obtenção do controle efetivo da doença.

Em relação a quantificação de actinomicetos e bactérias presentes no solo após o cultivo do feijoeiro dos tratamentos do experimento I, observou-se diferenças significativas entre os tratamentos, comparados com o solo sem cultivo (T0) e com o tratamento 1, em que as plantas são oriundas de sementes com infecção natural de Xapf, conforme Tabela 6.

Os tratamentos 3 e 4 apresentaram maior quantidade de UFCs de actinomicetos no solo, sugerindo que este permanece no solo após o cultivo. No tratamento 4 observou-se menor quantidade de bactérias, indicando que o agente de biocontrole exerce algum tipo de mecanismo que suprime a quantidade de bactérias de qualquer origem.

Tabela 6 – Quantificação de unidades formadoras de colônia (UFCs) de actinomicetos e de bactérias presentes no solo após o

cultivo do feijoeiro em diferentes tratamentos de semente com biocontrolador

Tratamentos*	UFCs g ⁻¹ de solo		pH do solo
	Actinomicetos	Bactérias	
T 0	1,1 x 10 ⁴ e	1 x 10 ⁴ e	7,09
T 1	2 x 10 ⁵ c	1,3 x 10 ⁵ c	7,11
T 2	1,7 x 10 ⁵ d	5,9 x 10 ⁵ a	7,17
T 3	3,2 x 10 ⁵ b	4,1 x 10 ⁵ b	7,24
T 4	4,1 x 10 ⁵ a	1,2 x 10 ⁵ d	7,22
Média	2,2 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁵	
CV (%)	0,01	0,93	

* Tratamentos: T0= solo sem cultivo, T1= solo com cultivo, semente controle, T2= solo com sementes inoculadas com patógeno, T3= solo com sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= solo com sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As bactérias, incluindo os actinomicetos são mais adaptados a valores de pH entre 6 e 8 (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Assim o pH dos solos obtido após o cultivo de feijoeiro está apropriado para funções vitais das células dos microrganismos, principalmente actinomicetos.

Os meios pelos quais os actinomicetos exercem o controle biológico de Xapf nas sementes e na parte aérea em plantas de feijoeiro, ainda não estão firmemente estabelecidos. A colonização competitiva ou uma competição por espaço e por nutriente pode ser um mecanismo de controle. No entanto, a indução de resistência pode ser o principal mecanismo exercido pelo biocontrolador contra Xapf, com eficiência no controle do CBCF.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- a) A capacidade do biocontrolador em controlar experimentalmente a doença, demonstra indícios de que esta bactéria nativa do solo, pode ser capaz de exercer controle biológico nas plantas de feijoeiro comum.

- b) O biocontrolador apresenta potencial significativo para aplicação como um método de controle preventivo e bacterostático de Xapf.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ENZIMÁTICA COMO RESPOSTA A AÇÃO DO BIOCONTROLADOR DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM DO FEIJOEIRO

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO⁵, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN⁶

RESUMO - Na interação patógeno-hospedeiro, moléculas ligadas com os mecanismos de defesa são ativadas. Com a quantificação da atividade de enzimas específicas indicadoras do estado de indução e envolvidas com a defesa, é possível evidenciar a forma do mecanismo de resistência, a ação do elicitor e o controle da doença. Para investigar se a indução de resistência pode estar envolvida como mecanismo de controle exercido por um agente biocontrolador do crestamento bacteriano comum do feijoeiro incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, determinou-se a atividade de quatro enzimas indicadoras do estado de indução. As sementes foram inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com o biocontrolador. As enzimas avaliadas foram peroxidases (PO), β -1,3-glucanases, fenilalanina amônia-liase (PAL) e polifenoloxidasas (PPO) e a concentração de proteínas totais. As comparações das atividades enzimáticas ao longo do ciclo da cultura revelam haver um aumento

⁵ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

⁶ Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF, norimar@upf.br.

significativo da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase, relacionadas com os mecanismos de defesa. As enzimas peroxidase e polifenoloxidase apresentaram poucas diferenças entre os tratamentos. A concentração de proteínas totais nas plantas tratadas com biocontrolador apresentou diferenças em relação ao controle e ao tratamento com inoculação do patógeno.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, *Xanthomonas*, peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase.

ENZYMATIC ACTIVITY AS REPLY THE ACTION OF THE BIOCONTROLLER OF THE COMMON BACTERIAL BLIGHT OF BEANS

ABSTRACT - In the interaction pathogen-host, on molecules with the defense mechanisms are activated. With the quantification of the activity of involved indicating specific enzymes of the state of induction and with the defense, it is possible to evidence the form of the mechanism of resistance, and action of the elicitor and of disease control. To investigate if the resistance induction it can be involved as mechanism of control exerted for a biocontroller agent of the common bacterial blight of beans caused for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, determined it activity of four enzymes indicating of the induction state. The seeds have been inoculated with the pathogen and microbiolized with the biocontroller. The evaluated enzymes have been peroxidases (PO), β -1,3-glucanase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenoloxidases (PPO) and the total

protein concentration. The comparisons of the enzymatic activities to the cycle dates of the crop had disclosed to have a significant increase of the activity of enzymes phenylalanine ammonia-lyase and β -1,3-glucanase, related with the defense mechanisms. The enzymes peroxidase and polyphenoloxidase showed few differences among the treatments. The total protein concentration in the plants dealt with biocontroller demonstrate differences in relation to the control and the treatment with inoculation of the pathogen.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, Xanthomonas, peroxidase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase, β -1,3-glucanase.

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo evolutivo, as plantas adquiriram uma sofisticada estratégia de defesa para ‘perceber’ o ataque de patógenos, traduzindo essa percepção em uma resposta apropriada e de forma adaptativa. As rotas de sinalização se intercalam, fornecendo as plantas um grande potencial de regulação para uma resposta de defesa refinada.

Plantas tratadas com moléculas elicitoras podem desencadear além das respostas de resistência, uma expressão simultânea de diversos mecanismos de defesa, resultando no chamado fenômeno da indução de resistência. Caracterizando-se por transformar uma relação compatível entre planta e patógeno numa relação incompatível.

O estudo da indução de resistência pela ação de agentes bióticos, vem sendo investigado por inúmeros pesquisadores, por ser um dos mecanismos de controle de doenças. A atividade de enzimas oxidativas como peroxidases e polifenoloxidasas, tem sido amplamente estudada em plantas, como parte dos mecanismos de defesas induzidas, ou em condições de estresse (SÁNCHEZ et al., 2000). As polifenoloxidasas oxidam um vasto grupo de fenóis sem a necessidade de H_2O_2 , já as peroxidases catalisam reações de oxidação utilizando o H_2O_2 como aceptor de elétrons, atuando em vários processos metabólicos como a biossíntese de etileno, descarboxilação do ácido indol acético, lignificação da parede celular e respostas de estresse em geral (NOJOSA et al., 2003; SIEGEL, 1993). As β -1,3-glucanases são capazes de desencadear os mecanismos de defesa da planta, além de terem efeito direto sobre o patógeno (VAN LOON et al., 1994). As enzimas fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase estão envolvidas na rota biossintética dos fenilpropanóides, sendo que a PAL é produtora de fenólicos como flavonóides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzóico (SARMA et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi verificar se a indução de resistência pode estar envolvida como mecanismo de controle exercido por um agente biocontrolador do crescimento bacteriano comum do feijoeiro, através da determinação de alterações na atividade de quatro enzimas indicadoras do estado de indução e na concentração de proteínas totais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitobacteriologia e casa-de-vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, RS, no período de setembro de 2004 a outubro de 2005. As sementes utilizadas foram oriundas de lavouras de produção de sementes da Região Norte do Estado do Rio Grande do Sul, safra 2003/2004, Cultivar BRS Valente. A escolha da Cultivar BRS Valente foi devido a melhor produtividade, com cerca de 215 g o peso de 1000 sementes, além de estar entre as cultivares registradas de feijão preto, indicadas para o cultivo no Rio Grande do Sul na safra 2003/2004.

2.1 Inoculação das sementes

A inoculação das sementes consistiu na adição de 3,5 mL da suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var *fuscans* (Xapf) (VAUTERIN et al., 1995), com concentração celular de $1,2 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹, sobre 500 g de sementes, acondicionadas em sacos plásticos, os quais foram fechados e agitados suavemente, de modo que todas as sementes entrassem em contato com a suspensão.

2.2 Microbiolização das sementes

A microbiolização das sementes constituiu da adição de 3,5 mL do biocontrolador (AGOSTINI, 2004), com uma concentração de $1,6 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de actinomiceto, sobre 500 g de sementes,

acondicionadas em sacos plásticos. Para a completa cobertura das sementes, os sacos foram fechados e agitados suavemente por 10 minutos e mantidos em ambiente limpo durante 3 horas.

2.3 Experimentos

2.3.1 Experimento I

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural de 5×10^4 UFC g⁻¹ de semente com Xapf.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural mais a inoculação com Xapf.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural mais a inoculação com Xapf, mais a microbiolização com biocontrolador.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural mais microbiolização com biocontrolador.

As sementes foram semeadas em solo corrigido conforme CEPEF (2003), sendo que em cada tratamento foram semeadas 50 sementes distribuídas em dez vasos de três kg. O delineamento experimental aplicado foi o inteiramente casualizado, em que adotou-se dez repetições, sendo a parcela experimental representada por um vaso de 3 kg com cinco plantas.

2.3.2 Experimento II

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural com Xapf mais aspersão foliar com água.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural com Xapf mais uma aplicação foliar com biocontrolador, aos 35 dias após a semeadura.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural com Xapf mais duas aplicações foliares com biocontrolador, aos 35 e 50 dias após a semeadura.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural com Xapf mais três aplicações foliares com biocontrolador, aos 35, 50 e 65 dias após a semeadura.

As sementes foram semeadas como no Experimento I, adotando-se o mesmo delineamento experimental.

2.3.2.1 Aplicação do biocontrolador na parte aérea

O preparo do biocontrolador foi o mesmo utilizado para a microbiolização das sementes. Da suspensão contendo $2,7 \times 10^8$ UFCs mL^{-1} de actinomiceto tomou-se 10 mL acrescentado em 20 mL do veículo, constituindo o biocontrolador. Diluiu-se 25 mL do biocontrolador em 400 mL de água destilada e esterilizada. A concentração de actinomiceto para aplicação foliar após a diluição da formulação em água foi de $2,2 \times 10^7$ UFCs mL^{-1} . O biocontrolador foi aplicado por aspersão em toda parte aérea das plantas até o ponto de escorrimento, em intervalos de 15 dias conforme cada tratamento do experimento II. O controle foi aspergido com água destilada esterilizada, para simular as mesmas condições.

2.4 Coleta do tecido foliar

O tecido foliar foi coletado a partir do completo desenvolvimento do primeiro trifólio até a floração em intervalos de 15 dias, aos 34, 49, 64 e 79 dias após a semeadura, totalizando quatro coletas ao longo do ciclo no experimento I. No experimento II o tecido foliar foi coletado momentos antes da aplicação foliar e quatro dias após a aplicação. Em cada coleta foram retirados dez folíolos por tratamento, armazenados em sacos de papel à -10 °C.

2.5 Preparo do extrato vegetal

Cada amostra contendo dez folíolos (3 g de tecido fresco) foi triturada em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, adicionando-se ao macerado 3 mL g⁻¹ de tecido de tampão de extração contendo uma solução tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,5, polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1mM. O preparado foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante, coletado e mantido a 4 °C durante os ensaios enzimáticos (BARACAT-PEREIRA et al., 2001).

2.5.1 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976), ajustando-se uma curva padrão, determinada previamente através de soluções com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina, correlacionando

a concentração de proteínas com leituras de absorvância, em espectrofotômetro a 595 nm (ALFENAS et al., 1998). Os dados foram expressos em μg de proteínas. g^{-1} tecido.

2.5.2 Determinação da atividade de peroxidases

A atividade da peroxidase (PO, EC. 1. 11. 1. 7) foi determinada por método espectrofotométrico a 470 nm, em que o guaicol participa como doador de hidrogênio (MARTINEZ et al., 1998) formando tetraguaicol (CARUSO et al., 2001). A mistura da reação consistiu de 1019 μl de uma solução de substrato contendo 125 μl de guaicol, 153 μl de peróxido de hidrogênio em 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,0 e 1 μl do extrato vegetal.

A mistura da reação foi incubada em banho-maria a 30 °C, realizando-se leituras de absorvância em comprimento de onda de 470 nm, aos 0,5, 5,5, 10,5 e 15,5 minutos após a adição do extrato. A atividade foi determinada pelo diferencial entre o primeiro e o último tempo de leitura da absorvância. Os resultados foram expressos em unidades de PO.g^{-1} tecido. min^{-1} , admitindo-se que uma unidade PO equivale ao incremento de absorvância de $0,001 \text{ min}^{-1}$.

2.5.3 Determinação da atividade de β -1,3-glucanases

A atividade das β -1,3-glucanases (EC. 3. 2. 1. 6), nas amostras foi determinada espectrofotometricamente por teste

colorimétrico que avalia a glicose liberada da laminarina (substrato), após o uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (HAPHB).

A mistura da reação consistiu de 220 μL do tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, 250 μL da solução do substrato laminarina a 4 mg mL^{-1} e 30 μL do extrato vegetal, incubando-se a 45 °C por uma hora. Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL da solução de desenvolvimento de cor, composta por 0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico dissolvidos em 10 mL de HCl 0,5 M e 50 mL de NaOH 0,5 M, sendo em seguida a mistura aquecida a 100 °C por 5 minutos. Reações de cada amostra, adicionadas da solução de desenvolvimento de cor e aquecidas no momento da adição do extrato foram utilizadas como controle. Após resfriamento, as absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 410 nm (HALFELD-VIEIRA, 2002). A atividade da enzima foi determinada pela diferença entre os valores de absorbância para cada reação após uma hora de incubação e os valores de absorbância da reação controle. Os resultados foram expressos em unidades de β -1,3-glucanase. g^{-1} tecido. min^{-1} , admitindo-se que uma unidade β -1,3-glucanase equivale ao incremento de absorbância de 0,001 min^{-1} .

2.5.4 Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL, EC. 4. 3.1. 5) foi quantificada por medida espectrofotométrica a 290 nm, após conversão de L-fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico, monitorada em intervalos definidos entre 0,5 e 3,5 minutos após o início da reação a 37 °C (adaptado de PASCHOLATI et al., 1986). A mistura de reação

constituiu-se de 10 µl do extrato vegetal e 1000 µl de solução a 0,2% (p/v) de L-fenilalanina. O diferencial entre os valores de absorbância no intervalo de tempo foi calculado e os resultados foram expressos em unidades de PAL.g⁻¹ tecido.min⁻¹. Uma unidade de PAL equivale ao incremento de 0,001 min⁻¹ na absorbância.

2.5.5 Determinação da atividade de polifenoloxidasas

A atividade das polifenoloxidasas (PPO, EC. 1. 10. 3. 1), foi determinada pela oxidação do catecol para quinona, no ensaio preparado com 1 mL de pirocatequina a 20 mM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 6,8 e 34 µl do extrato vegetal, incubando-se a mistura a 30 °C. As leituras em espectrofotômetro a 420 nm foram realizadas em períodos de 0,5, 5,5 e 10,5 minutos. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para determinação da atividade. Uma unidade de atividade de PPO foi definida como o incremento de absorbância de 0,001 min⁻¹ (DUANGMAL & APENTEM, 1999). Os resultados foram expressos em unidades de PPO.g⁻¹ tecido.min⁻¹.

2.5.6 Representação e análise dos resultados

Os resultados da concentração de proteínas totais e das atividades para cada enzima foram expressos em relação ao peso fresco do tecido do material vegetal submetido à extração. A análise estatística dos ensaios foi realizada através do programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC), versão 8.0,

utilizando o procedimento General Linear Model e Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores apresentados nas tabelas comparam plantas dos diferentes tratamentos, em quatro épocas de coleta ao longo do ciclo da cultura. As sementes utilizadas nos experimentos germinaram após sete dias da sementeira e foram acompanhadas até a floração.

No experimento I, em que o biocontrolador foi microbiolizado nas sementes, observou-se diferenças significativas em relação a concentração de proteínas totais, analisadas nos quatro tratamentos e nos diferentes dias após a sementeira, conforme Tabela 1.

Na análise da concentração de proteínas totais, observou-se que aos 34 dias após a sementeira o tratamento 2, cujas sementes foram inoculadas com o patógeno, apresentou baixa quantidade de proteína em relação aos demais tratamentos, sugerindo que uma quantidade maior do patógeno presente nas sementes, pode interferir no processo de formação de proteínas, entre estas algumas relacionadas com a defesa.

Aos 64 dias após a sementeira, o tratamento 3 apresentou baixa quantidade de proteínas e o tratamento 1 apresentou alta concentração de proteínas. De modo geral, o tratamento 4 não apresentou oscilação na concentração de proteínas, com uma tendência a manter-se constante aos 49, 64 e 79 dias. O mesmo não foi observado para os demais tratamentos, inclusive o controle (T1), que

apresentou concentração baixa aos 79 dias igualando-se ao tratamento 3 em que as plantas foram inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com o biocontrolador.

Tabela 1 – Concentração de proteínas totais determinadas em amostras de plantas de feijoeiro submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura

Tratamentos*	Proteínas totais ($\mu\text{g. g}^{-1}$ tecido)			
	Dias após a semeadura			
	34	49	64	79
T1	30,59 b	33,33 a	30,08 a	16,74 c
T2	16,00 c	30,57 b	20,04 c	27,79 a
T3	33,50 a	24,46 d	8,36 d	16,70 c
T4	30,59 b	25,07 c	25,06 b	25,07 b
Média	27,67	28,36	20,88	21,57
CV (%)	0,31	0,12	0,30	0,30

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise da atividade enzimática das quatro enzimas os valores apresentados nas tabelas correspondem às médias das repetições de cada amostra analisada.

Na atividade da enzima peroxidase, não houve diferenças significativas entre os tratamentos aos 34 e 64 dias, utilizando como estatística o Teste de Tukey a 5% de probabilidade, conforme representação na Tabela 2.

Todos os tratamentos, aos 34 dias não apresentaram diferenças na atividade da PO. No entanto, observou-se que o tratamento 3, onde as plantas foram submetidas da inoculação com o patógeno e microbiolização com biocontrolador, apresentou atividade superior da enzima nos dias 49 e 79, sugerindo que patógeno e biocontrolador juntos, induzem a planta à uma maior atividade da PO.

Campos et al. (2004), constataram que a atividade da peroxidase foi significativamente maior nas plantas tratadas com o fungo indutor *Colletotrichum lindemuthianum*, antes e após a inoculação com o patótipo virulento. Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 2 – Atividade da peroxidase (PO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura

Tratamentos*	Atividade da PO (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)			
	Dias após a semeadura			
	34	49	64	79
T1	44,33 a	124,78 b	74,56 a	85,89 b
T2	43,11 a	93,89 b	73,67 a	75,67 b
T3	66,22 a	201,78 a	110,00 a	199,89 a
T4	38,11 a	104,67 b	92,89 a	71,22 b
Média	47,94	131,28	87,78	108,17
CV (%)	43,26	21,50	27,28	26,76

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O tratamento 2 apresentou baixa atividade da PO nas quatro épocas da avaliação, sugerindo que plantas oriundas de sementes com altos níveis de infecção com Xapf, apresentam menor atividade da enzima. Uma vez que a peroxidase está relacionada com os mecanismos de defesa da planta.

A atividade da enzima β -1,3-glucanase apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, além de variações nos quatros dias em que as amostras foram analisadas, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade da β -1,3-glucanase determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura

Tratamentos*	Atividade da β -1,3-glucanase (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)			
	Dias após a semeadura			
	34	49	64	79
T1	160,33 b	33,33 d	11,78 c	46,67 ab
T2	176,22 a	52,33 c	130,11 a	61,11 a
T3	154,11 b	220,22 a	21,78 c	44,56 b
T4	124,89 c	88,56 b	75,78 b	53,00 ab
Média	153,89	98,61	56,86	51,33
CV (%)	3,94	7,11	7,46	11,85

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Aos 34 dias todos os tratamentos apresentaram alta atividade e poucas diferenças entre si. A enzima β -1,3-glucanase está envolvida com processos fisiológicos, entre eles a germinação de

sementes, além da resposta ao estresse biótico e abiótico. Esta alta atividade no início do ciclo da cultura, pode ser oriunda do processo de germinação somado a presença de patógenos e do agente biocontrolador na semente.

Aos 49 dias apenas o tratamento 3 apresentou alta atividade da enzima. O tratamento 2 e 3 apresentaram variações bruscas aos 49, 64 e 79 dias após a semeadura. Estas variações podem estar relacionadas com a ativação da enzima em diferentes processos. Conforme Morohashi & Matsushima (2000), a enzima β -1,3-glucanase é importante por atuar em diversos processos fisiológicos das plantas, como a germinação de sementes, desenvolvimento de pólen, resposta de estresses, florescimento e mobilização de moléculas de reserva.

O aumento da atividade do tratamento 3, de 154,11 aos 34 dias para 220,22 unidades de β -1,3-glucanase aos 49 dias é esperado, uma vez que esta enzima é acumulada gradativamente em resposta a infecção por patógenos (HALFELD-VIEIRA, 2002). O tratamento 4 apresentou diferenças significativas em relação ao controle (T1), a partir da primeira época e permanecendo até a terceira, indicando uma possível resposta de resistência induzida pelo agente de biocontrole.

Na análise da atividade da PAL, diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos, nos diferentes dias após a semeadura, conforme Tabela 4.

As semelhanças encontradas nos tratamentos 2 e 3 aos 34 e 64 dias, indicam que a planta utiliza constitutivamente esta enzima como fator de resistência à infecção pelo patógeno.

Na interação planta-patógeno a indução da produção de peroxidase constitui um dos primeiro eventos, diretamente relacionado ao fenômeno da “explosão oxidativa”. O fenômeno contribui para uma rápida produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs), que causam a morte celular e possuem atividade antimicrobiana, agindo diretamente sobre o patógeno (HALFELD-VIEIRA, 2002). Desta maneira, pode-se inferir que no tratamento 3, as EAOs foram capazes de agir contra o patógeno, devida a sua alta concentração, observada na atividade da peroxidase, o que talvez não tenha permitido em aumento da atividade da PAL.

Tabela 4 - Atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura

Tratamentos*	Atividade da PAL (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)			
	Dias após a semeadura			
	34	49	64	79
T1	136,11 a	84,44 c	180,56 a	147,44 b
T2	105,11 c	134,22 b	136,33 b	135,56 c
T3	105,56 c	147,56 a	134,78 b	165,44 a
T4	130,67 b	132,11 b	105,22 c	118,78 d
Média	119,36	124,58	139,22	141,80
CV (%)	0,50	0,71	0,47	0,39

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à atividade da enzima polifenoloxidase, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, nas quatro épocas analisadas, conforme Tabela 5.

O tratamento 4 apresentou uma tendência de maior na atividade da enzima em relação aos demais tratamentos, com aumento gradativo ao longo do ciclo da cultura. Podendo inferir que o agente biocontrolador induz a atividade da PPO, em sementes com infecção natural de Xapf.

Tabela 5 – Atividade da polifenoloxidase (PPO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro, submetidas ao tratamento de sementes com biocontrolador, em diferentes dias após a semeadura

Tratamentos*	Atividade da PPO (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)			
	Dias após a semeadura			
	34	49	64	79
T1	11,89 a	11,33 a	10,78 a	15,44 a
T2	9,89 a	9,56 a	17,89 a	13,67 a
T3	7,78 a	13,11 a	12,67 a	14,00 a
T4	13,00 a	17,44 a	16,00 a	18,00 a
Média	10,64	12,86	14,33	15,28
CV (%)	22,59	37,10	30,04	33,99

* Tratamentos: T1= controle, T2= sementes inoculadas com patógeno, T3= sementes inoculadas com o patógeno e microbiolizadas com biocontrolador, T4= sementes microbiolizadas com biocontrolador. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A baixa atividade da PPO no tratamento 2, aos 34 e 49 dias e no tratamento 3 aos 34 dias, pode estar ligado ao fato do

patógeno reduzir os níveis de PPO para facilitar o processo de infecção através da produção de toxinas. Halfeld-Vieira (2002), encontrou resultados semelhantes em estudos com o patossistema tomateiro – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Mozzetti et al. (1995), observaram que a PO foi estimulada em todas as folhas de pimentão inoculadas com *Phytophthora capsici*, nas folhas de plantas suscetíveis, os níveis de PO aumentaram drasticamente com o progresso da doença. Neste mesmo patossistema, a inoculação do patógeno não acentuou a atividade da PAL e da β -1,3-glucanase. No entanto, induziu mudanças significativas na atividade da PPO após algum tempo, resultados semelhantes foram encontrados nos tratamentos 2, 3 e 4 em relação a atividade de PPO, neste trabalho.

No experimento II, as plantas foram submetidas a aplicação foliar do biocontrolador e analisadas momentos antes da aplicação e quatro dias depois da aplicação. Foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas totais, nas plantas submetidas a aplicação do biocontrolador na parte aérea da planta, conforme Tabela 6.

Todos os tratamentos apresentaram diferenças nas concentrações de proteínas aos 35 dias. Após a aplicação com o biocontrolador (aos 39 dias) os tratamentos 2, 3 e 4 tiveram um significativo aumento na concentração das proteínas totais, comparado aos 35 dias, antes da aplicação, fato este observado também após a aplicação seguinte aos 54 dias no tratamento 4.

Após a terceira aplicação com o biocontrolador, aos 65, realizado somente no tratamento 4, as concentrações das proteínas

apresentaram mudanças significativas. Aos 69 dias, houve redução nos tratamentos 1, 2 e 4, e aumento no tratamento 3 da concentração de proteínas totais.

Tabela 6 – Concentração de proteínas totais determinadas em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar do biocontrolador

Tratamentos*	Proteínas totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tecido)					
	Dias após a semeadura					
	35 **	39	50**	54	65**	69
T1	30,54 c	30,12 d	30,58 d	50,47 d	41,07 d	37,79 d
T2	27,78 d	36,87 c	65,19 c	73,48 b	46,68 b	60,12 a
T3	32,24 a	50,16 a	67,77 a	67,80 c	44,39 c	47,40 b
T4	31,06 b	43,44 b	66,76 b	75,72 a	50,50 a	40,03 c
Média	30,40	40,15	57,57	66,87	53,16	46,33
CV (%)	0,16	0,36	0,21	0,13	0,19	0,17

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

** Aspersão das plantas com biocontrolador ou água (controle).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade da enzima peroxidase apresentou estatisticamente poucas diferenças entre os tratamentos, apresentando diferenças após a aplicação com o biocontrolador, conforme Tabela 7.

Todos os tratamentos apresentaram aumento da atividade da PO, após a aplicação com o biocontrolador. Um fato curioso foi o aumento da atividade da enzima no tratamento controle (T1) onde as plantas foram aspergidas com água, nas duas primeiras aplicações e

redução na última aplicação. Fato este que pode estar relacionado a outros fatores, que não a aspersão.

Tabela 7 – Atividade da peroxidase (PO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar do biocontrolador

Tratamentos*	Atividade de PO (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)					
	Dias após a semeadura					
	35 **	39	50**	54	65**	69
T1	44,44 a	130,89 a	77,00 a	154,67 a	112,67 a	62,22 ab
T2	47,56 a	71,00 b	60,44 a	46,00 b	92,44 a	55,89 ab
T3	44,33 ab	80,67 ab	70,56 a	146,00 a	123,00 a	82,78 a
T4	40,00 b	59,22 b	60,00 a	131,33 a	101,89 a	27,56 b
Média	44,08	85,44	67,00	119,5	107,5	57,11
CV (%)	3,79	26,13	28,90	18,00	19,89	35,67

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

** Aspersão das plantas com biocontrolador ou água (controle).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em condições de estresse, as plantas produzem elevadas quantidades da enzima peroxidase, caracterizando-se por ser a primeira enzima a alterar a sua atividade, não sendo limitada pelo tipo de estresse aplicado ou o substrato empregado (SIEGEL, 1993).

Os tratamentos 3 e 4, apresentaram aumento da PO após a segunda aplicação, comparando-se com o tratamento 2, que foi realizada apenas a primeira aplicação, pode-se inferir que o biocontrolador promoveu aumento da atividade da PO após duas

aplicações de 15 em 15 dias na parte aérea da planta. Resultados semelhantes foram encontrados por Nandakumar et al. (2001), em plantas de arroz expressaram grandes quantidades da enzima peroxidase, nas quais foram inoculadas com o patógeno, independente do tratamento com a bactéria *Pseudomonas*, indutora de resistência. Embora o aumento da atividade da peroxidase tenha iniciado 24 h após a inoculação desafiadora, a atividade aumentou mais e permaneceu significativamente alta de 96 a 164 h somente nas plantas tratadas com *Pseudomonas*. Nas plantas não tratadas com *Pseudomonas* e nem inoculadas com o patógeno desafiador, não foram observadas mudanças na atividade da peroxidase.

A atividade da enzima β -1,3-glucanase, apresentou poucas diferenças entre os tratamentos, conforme Tabela 8.

Os tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram aumento da atividade da enzima após a primeira aplicação com o biocontrolador. Os tratamentos 2 e 4 permaneceram com a atividade alta até os 54 dias, apresentando uma redução brusca aos 65 dias. Fato este não observado para o tratamento 3, que teve as mesmas condições que o tratamento 4. Em estudos realizados por Dalisay & Kuc (1995), a atividade da enzima β -1,3-glucanase foi baixa nas plantas de pepino induzidas e não teve aumento significativo nos diferentes dias após a indução, comparado com a atividade das plantas não induzidas, diferente do encontrado neste trabalho.

Kemp et al. (1999) em trabalho realizado com trigo, relataram que os níveis de atividade de β -1,3-glucanases em resposta a infecção com *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* foram elevados nas plantas suscetíveis e nas resistentes, respondendo com um rápido

aumento da atividade da enzima 12 h após a inoculação estendendo-se até 137 h após a inoculação. A enzima β -1,3-glucanases também está presente em plantas não inoculadas com o patógeno, no entanto, apresentam níveis de atividade significativamente mais baixo. Isso se deve ao fato que a enzima já está presente naturalmente no apoplasto e a liberação do sinal de ativação de defesa ocorre no contato do patógeno com a parede celular da planta.

Tabela 8 – Atividade da β -1,3-glucanase determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar do biocontrolador

Tratamentos*	Atividade da β -1,3-glucanase (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)					
	Dias após a semeadura					
	35 **	39	50**	54	65**	69
T1	32,56 a	32,56 b	19,00 b	15,11 a	5,56 a	16,00 b
T2	34,11 a	51,67 a	49,89 a	51,22 a	7,44 a	51,00 a
T3	32,33 a	52,33 a	51,89 a	15,67 a	8,11 a	57,33 a
T4	33,22 a	53,44 a	51,89 a	62,67 a	7,56 a	46,89 a
Média	33,05	47,5	43,17	36,17	7,17	42,80
CV (%)	4,45	3,03	4,28	112,76	20,18	11,27

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

** Aspersão das plantas com biocontrolador ou água (controle).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O aumento da atividade da β -1,3-glucanase aos 69 dias, pode estar relacionado com o início da floração que ocorreu próximo a esta data, uma vez que esta enzima está ligada ao processo fisiológico

da floração. Em relação à análise realizada para verificar a atividade da PAL, diferenças significativas ocorreram entre os tratamentos, conforme Tabela 9.

Tabela 9 – Atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação foliar com biocontrolador

Tratamentos*	Atividade da PAL (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)					
	Dias após a semeadura					
	35 **	39	50**	54	65**	69
T1	136,78 a	117,89 a	81,78 c	167,44 c	167,56 a	145,11 c
T2	133,44 c	109,78 b	163,89 ab	95,33 d	173,89 a	148,89 b
T3	133,55 c	108,67 bc	165,89 a	195,44 a	119,60 a	96,00 d
T4	134,89 b	107,33 c	162,33 b	193,78 b	175,22 a	157,56 a
Média	134,67	110,92	143,47	163,00	159,07	136,89
CV (%)	0,22	0,51	0,70	0,32	27,89	0,45

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

** Aspersão das plantas com biocontrolador ou água (controle).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A atividade da PAL foi reduzida em todos os tratamentos após a primeira aplicação com biocontrolador e água (controle). O tratamento 2 apresentou redução na atividade da enzima comparada com os demais tratamentos aos 54 dias, tornando a aumentar aos 65 dias. O tratamento 4 permaneceu com atividade alta em todas as épocas avaliadas, ocorrendo uma pequena redução após a primeira e a terceira aplicação.

Zhao et al. (2005) observaram que as plantas que receberam estímulo de estresse apresentaram alta atividade da enzima PO e PAL, em relação aquelas que não receberam o estímulo. Também no mesmo trabalho, os autores observaram que as plantas inoculadas com o patógeno apresentaram alta atividade destas enzimas. As plantas de pepino estimuladas mostraram sintomas de resistência a *Cladosporium cucumerinum* e os estímulos em plântulas induziram a resistência ao patógeno.

A atividade da enzima PPO, apresentou poucas diferenças entre os tratamentos, conforme Tabela 10.

Tabela 10 – Atividade da polifenoloxidase (PPO) determinada em amostras de plantas de feijoeiro submetidas a aplicação do biocontrolador na parte aérea

Tratamentos*	Atividade da PPO (unidade.g ⁻¹ tecido.min ⁻¹)					
	Dias após a semeadura					
	35 **	39	50**	54	65**	69
T1	5,89 a	7,11 b	7,89 b	21,89 ab	18,89 a	16,33 a
T2	6,89 a	21,56 a	9,78 ab	9,22 b	18,56 a	13,89 a
T3	6,33 a	23,22 a	12,67 a	34,22 a	15,89 a	7,67 a
T4	6,00 a	23,78 a	8,22 b	31,00 a	17,56 a	15,22 a
Média	6,28	18,92	9,64	24,08	17,72	13,28
CV (%)	13,96	18,61	15,75	27,85	22,16	29,24

* Tratamentos: T1= aspersão com água (controle), T2= uma aplicação com biocontrolador, T3= duas aplicações com biocontrolador, T4= três aplicações com biocontrolador.

** Aspersão das plantas com biocontrolador ou água (controle).

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos 2, 3 e 4 apresentaram aumento significativo na atividade de PPO após a primeira aplicação com o biocontrolador e os tratamentos 3 e 4 após a segunda aplicação, em relação ao controle (T1), sugerindo que a atividade da enzima é alterada com a aplicação do agente biocontrolador. Com estes resultados pode-se inferir que o biocontrolador tem ação indutora na atividade da enzima PPO.

Agrios (1997) constatou que ocorre maior atividade da polifenoloxidase nos tecidos infectados de cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis ou em plantas saudas. Por isso a importância da atividade da polifenoloxidase na resistência a doenças. A atividade da enzima, provavelmente, está ligada à capacidade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento (CAMPOS et al., 2004).

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- a) O agente biocontrolador é um tipo de elicitor que induz a uma resposta de resistência, alterando a atividade de enzimas relacionadas com a defesa nas plantas.

CAPÍTULO III

ATIVIDADE DE ISOPEROXIDASES EM FEIJOEIRO SOB A AÇÃO DE UM BIOCONTROLADOR DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM

CHEILA CRISTINA SBALCHEIRO⁷, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN⁸, SANDRA PATUSSI BRAMMER⁹

RESUMO: A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil apresenta constantes danos, associados à ocorrência do crestamento bacteriano comum, incitado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da isoenzima peroxidase na indução de resistência ao crestamento bacteriano comum do feijoeiro, em resposta ao tratamento com biocontrolador. As plantas foram avaliadas quanto à atividade enzimática, em plântulas no estágio V2 de desenvolvimento, e em quatro épocas do ciclo da cultura. As plantas foram submetidas a inoculação do patógeno nas sementes, a microbiolização e a aspersão da parte aérea com o biocontrolador. Foram detectados 15 padrões de bandas em plântula e 12 padrões em diferentes épocas do ciclo da cultura, tanto nos tratamentos de sementes como nos de parte aérea. Significativas diferenças entre tratamentos foram observadas, ocorrendo diferenças quantitativas (presença e ausência de bandas)

⁷ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

⁸ Orientadora, Bióloga, Dra. Professora da FAMV/UPF, norimar@upf.br.

⁹ Bióloga, Dra. Pesquisadora da Embrapa – Trigo, sandra@cnpt.embrapa.br.

quando os tratamentos e os dias após a semeadura foram comparados. Constatou-se o aparecimento de isoperoxidasas na região catódica apenas nos tratamentos com o biocontrolador, sugerindo-se a detecção dessa enzima para uso em seleção assistida.

Palavras-chave: Isoenzima, peroxidase, *Phaseolus vulgaris*, *Xanthomonas*.

ACTIVITY OF ISOPEROXIDASES IN BEANS UNDER THE ACTION OF A BIOCONTROLLER OF THE COMMON BACTERIAL BLIGHT

ABSTRACT: Beans crop in Brazil constant shows damages associated to the occurrence of the common bacterial blight of bean, incited by the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. The objective of this work was to evaluate the activity of the isoenzyme peroxidase in the induction of resistance to the common bacterial blight of beans, in sponse to the treatment with biocontroller. The plants were evaluated as to enzymatic activity, in seedlings at V2 development stage, and at four cycle dates of the crop. The plants were submitted to inoculation of the pathogen in the seeds, microbiolization, and aspersion of above-ground parts with the biocontroller. Fifteen band patterns at seedling and twelve patterns at different cycle dates of the crop were detected, both in seeds and above-ground treatments. Significant differences among treatments were observed, occurring quantitative differences (presence and absence of bands) when the treatments and the days after sowing were

compared. The appearance of isoperoxidases in the cathodic region was evidenced in the treatments with the biocontroller only and the detection of this enzyme for use in assisted selection is suggested.

Key words: Isoenzyme, peroxidase, *Phaseolus vulgaris*, Xanthomonas.

1 INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro (CBCF), causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf) (VAUTERIN et al., 1995), é de difícil controle. Novas estratégias para o controle de doenças estão sendo estudadas, entre elas o controle biológico e a indução de resistência nas plantas através de microrganismos não patogênicos.

Os compostos produzidos pelas plantas, durante o processo de infecção, são fundamentais na resistência ao organismo invasor e a sobrevivência da planta. De acordo com Burdon & Marshall (1983), os estudos isoenzimáticos em casos de estresses bióticos e abióticos, estão relacionados ao entendimento das mudanças metabólicas e mecanismos de defesa desencadeados pelas plantas.

O sistema de eletroforese com isoenzimas é uma técnica bioquímica amplamente utilizada em estudos de indução de resistência em plantas, pois as enzimas estão diretamente ligadas com os mecanismos de defesa desencadeados pelas plantas em resposta a infecção por patógenos ou por agentes de indução. Além de ser considerada uma técnica de custo baixo e de ótimos resultados, e

apresentar polimorfismos enzimáticos mais próximos da expressão fenotípica final do que os polimorfismos de DNA, bem como serem um produto intermediário da expressão do gene (BRAMMER et al., 2002; TORGGLER et al., 1995).

As peroxidases incluem um grupo de enzimas capazes de catalisar a transferência do hidrogênio de um doador para H_2O_2 . Em plantas, a ação constitui numa proteção antioxidativa, sendo caracterizadas na germinação de sementes e nos estádios de crescimento (LIMA et al., 1997). Múltiplas formas de peroxidases são amplamente distribuídas em todas as plantas. Esta enzima está envolvida em diversas reações celulares, como a oxidação de compostos fenólicos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de polissacarídeos, ligações com monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos, regulação da alongação de células e outras (KAO, 2003; LEE et al., 2001).

A peroxidase tem papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas. Esta enzima está fortemente relacionada com mecanismos de defesa em relação à patógeno e vários estresses abióticos. Gaspar et al. (1986), estudando a atividade da peroxidase durante o crescimento e desenvolvimento, relacionaram alterações na atividade da peroxidase com mudanças morfogênicas em resposta a estresse físico, químico e biológico.

Além disso, o metabolismo da planta quando afetado por estresses bióticos, como a infecção por patógenos, influencia na intensidade da atividade enzimática desencadeando, assim, o surgimento de formas moleculares múltiplas, por ativação de genes (GOTTLIEB, 1982).

A peroxidase pode ser tomada como um marcador bioquímico de estresse resultante de fatores bióticos e abióticos, pelo fato de ser a primeira enzima a ter atividade alterada, produzindo elevadas quantidades quando a planta é submetida a condições de estresse, independente do substrato ou do estresse aplicado (SIEGEL, 1993).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade da isoenzima peroxidase na indução de resistência ao cretamento bacteriano comum do feijoeiro, em resposta ao tratamento com o biocontrolador com ação de indutor biológico de resistência.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Trigo e casa-de-vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, Passo Fundo-RS. As sementes utilizadas foram oriundas de lavouras de produção de sementes da Região Norte do Estado do Rio Grande do Sul, safra 2003/2004, Cultivar BRS Valente. A escolha da Cultivar BRS Valente foi devido a melhor produtividade, com cerca de 215 g o peso de 1000 sementes, além de estar entre as cultivares registradas de feijão preto, indicadas para o cultivo no Rio Grande do Sul na safra 2003/2004.

2.1 Inoculação das sementes

A inoculação das sementes consistiu na adição de 3,5 mL de suspensão de Xapf, com concentração celular de unidades

formadoras de colônia (UFCs) de $1,2 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹, sobre 500 g de sementes, acondicionadas em sacos plásticos, os quais foram fechados e agitados suavemente, de modo que todas as sementes entrassem em contato com a suspensão.

2.2 Microbiolização das sementes

A microbiolização das sementes constituiu da adição de 3,5 mL do biocontrolador (AGOSTINI, 2004), com uma concentração de $1,6 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de actinomiceto, sobre 500 g de sementes, acondicionadas em sacos plásticos. Para a completa cobertura das sementes, os sacos foram fechados e agitados suavemente por 10 minutos. Após foram mantidos em ambiente limpo durante 3 horas.

2.3 Experimentos

2.3.1 Experimento I

As sementes foram tratadas previamente com os seguintes tratamentos:

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural de 5×10^4 UFCs g⁻¹ de semente com Xapf.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural mais a inoculação com $1,2 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de Xapf.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural mais a inoculação com $1,2 \times 10^8$ UFCs mL⁻¹ de Xapf, mais a microbiolização com biocontrolador.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural mais microbiolização com biocontrolador.

Após o preparo dos tratamentos, 50 sementes de cada tratamento foram semeadas individualmente em copos plásticos de 250 mL contendo o seguinte substrato: vermiculita, areia e carvão na proporção 3:1:1. O tecido foliar foi coletado a partir dos 30 dias após a semeadura, no estágio V2 de desenvolvimento da cultura, realizando-se três coletas, denominadas de 1º, 2º e 3º época, com intervalos de cinco dias cada. Cada amostra constituiu-se de três discos foliares da mesma planta, sendo coletadas dez amostras de dez plantas diferentes, por tratamento em cada coleta, com delineamento inteiramente casualizado. As amostras foram mantidas a -4 °C, até a realização da análise das isoperoxidasas.

2.3.2 Experimento II

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural de 5×10^4 UFCs g^{-1} de semente com Xapf.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural mais a inoculação com Xapf.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural mais a inoculação com Xapf, mais a microbiolização com biocontrolador.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural mais microbiolização com biocontrolador.

As sementes foram semeadas em solo corrigido conforme CEPEF (2003), sendo que em cada tratamento foram semeadas 50 sementes distribuídas em dez vasos de três kg. O tecido foliar foi

coletado aos 34, 49, 64 e 79 dias após o plantio. Cada amostra constituiu-se de três discos foliares, oriundos de folíolos do terço médio de cada planta, sendo coletadas três amostras por tratamento em cada coleta. Os discos foliares foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL e mantidos a -4 °C.

2.3.3 Experimento III

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes com infecção natural com Xapf e aspersão foliar com água.

Tratamento 2 (T2): sementes com infecção natural com Xapf mais uma aplicação foliar com biocontrolador, aos 35 dias após da semeadura.

Tratamento 3 (T3): sementes com infecção natural com Xapf mais duas aplicações foliares com biocontrolador, aos 35 e 50 dias após da semeadura.

Tratamento 4 (T4): sementes com infecção natural com Xapf mais três aplicações foliares com biocontrolador, aos 35, 50 e 65 dias após da semeadura.

As sementes foram semeadas em solo corrigido, para cada tratamento foram semeadas 50 sementes distribuídas em dez vasos de 3 kg cada. Nos experimentos II e III, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo a parcela constituída de dez vasos com cinco plantas cada, para cada tratamento dos dois experimentos.

2.3.3.1 Aplicação com biocontrolador na parte aérea

O preparo do biocontrolador foi o mesmo utilizado para a microbiolização das sementes. Da suspensão contendo $2,7 \times 10^8$ UFCs mL^{-1} , tomou-se 10 mL acrescentado em 20 mL do veículo, constituindo o biocontrolador. A mistura foi agitada para uma completa uniformização. Diluiu-se 25 mL do biocontrolador em 400 mL de água destilada e esterilizada. A concentração de actinomicetos, para aplicação foliar após a diluição do biocontrolador em água foi de $2,2 \times 10^7$ UFCs mL^{-1} .

O biocontrolador foi aplicado por aspersão em toda parte aérea das plantas até o ponto de escorrimento, em intervalos de 15 dias conforme cada tratamento do experimento III. O controle foi aspergido com água destilada esterilizada, para simular as mesmas condições.

O tecido foliar de cada tratamento foi coletado momentos antes da aplicação e quatro dias após a aplicação com o biocontrolador. As amostras foram coletadas como no experimento II.

2.4 Eletroforese de isoenzimas

Para a análise das isoenzimas de peroxidase (PO, EC 1.11.1.7) foram utilizados três discos foliares com 8,44 mm de diâmetro, sendo que cada disco representou uma repetição. O tampão de extração das amostras constitui de nove partes do tampão tris-citrato 0,0595 M (pH 8,3) e uma parte do tampão borato de lítio 0,24 M (pH 8,3), segundo Scandalios (1969). Cada disco foliar foi

homogeneizado, manualmente, com auxílio de um bastão de vidro, junto com 50 µl do tampão de extração, em placas de acrílico mantidas sobre o gelo, a fim de evitar a desnaturação das enzimas. Sobre o homogeneizado foi colocado um disco de papel absorvente e, sobre este, papéis de aplicação das amostras (Whatman 3 MM com dimensões 4,0 mm x 1,0 mm).

As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida de 2 mm de espessura e dimensões de 18,0 cm x 18,0 cm, com concentração de 6%, preparados previamente, utilizando 100 mL do tampão do gel (o mesmo utilizado para a extração), acrescentando-se a 5,7 g de acrilamida e 0,3 g de bis-acrilamida, 100 µl de N, N, N', N', tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 1000 µl de persulfato de amônio a 10%. As mostras migraram por corrente contínua, migração horizontal e temperatura constante de 4 °C. A distância entre a ponte catódica e anódica foi de 12,0 cm e a intensidade de campo de 10 V/cm. A migração das amostras foi interrompida quando a linha de frente, marcada com azul de bromofenol, atingiu 10,0 cm.

2.4.1 Revelação dos géis

Após a migração, os géis foram corados com solução de benzidina, preparada previamente com 0,5 g de benzidina dissolvida em 9 mL de ácido acético glacial e 36 mL de água destilada, aquecida a 50 °C até a completa dissolução. Para a coloração do gel acrescentou-se sobre este 20 mL da solução de benzidina e 20 mL de peróxido de hidrogênio a 0,075%, sempre sob agitação. Após o aparecimento das bandas, cerca de 5 minutos, o gel foi lavado com

água destilada e adicionou-se 50 mL de álcool etílico 50% para a parada da reação por 10 minutos, e mantido em água destilada. A análise do gel foi realizada imediatamente após a coloração.

2.4.2 Análise das isoperoxidasas

As análises das isoperoxidasas foram baseadas na representação da migração absoluta (MA) em papel milimetrado, sendo anotadas as distâncias migradas pelas bandas a partir do ponto de aplicação, em centímetros, com precisão de 0,5 mm, bem como a intensidade de coloração de cada banda. A partir desse esquema, foi calculada a migração relativa (MR) de cada banda, em relação à da linha de frente, que recebeu o valor relativo igual a 1,00. A MR indica a relação entre a distância migrada pela banda em questão e a distância migrada pela linha de frente. Bandas de difícil visualização foram desconsideradas. Para cada MR, foi calculada a frequência da banda (FB), calculando-se o número de vezes que a banda aparece nas amostras, dividindo pelo número total de amostras (incluindo as repetições).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação encontrada em certas isoenzimas, pode ser devido a capacidade das plantas em sobreviver aos mais diversos ambientes. Desta forma, certos fatores como nutrição, temperatura, infecção por patógenos, presença de microrganismo não patogênicos na rizosfera e fitosfera, afetam o metabolismo da planta, influenciando

na intensidade da atividade enzimática. Pequenas mudanças na atividade da enzima podem induzir o surgimento de formas moleculares múltiplas, por estarem ligadas a ativação de genes (SBALCHEIRO et al., 2005).

Para o sistema de isoperoxidasas, observou-se diferenças significativas entre os tratamentos, ocorrendo apenas diferenças quantitativas (presença e ausência de banda), quando comparados os tratamentos e os dias após a semeadura.

No experimento I, foram detectados 15 padrões de bandas, cujas MRs variaram de 0,05 a 0,65 na região anódica e na região catódica MRs de -0,14 e -0,16. A variação qualitativa foi medida pela intensidade da banda, variando entre fraca, média e forte, conforme zimograma da Figura 1.

As bandas de MRs 0,10 e 0,05 apresentaram a maior frequência de bandas, sendo encontrada em todas as plantas, destacando-se das demais pela intensidade forte e média, respectivamente. As bandas de MRs 0,55, 0,57 e 0,65, não apareceram nas plantas do tratamento 1 (controle), indicando que estas bandas não são expressadas nas plantas no estágio V2 de desenvolvimento, com infecção natural do patógeno. Assim como, a banda de MR 0,20 não apareceu no tratamento 3, supondo-se que na interação entre o patógeno e o biocontrolador, com elevada infecção, a expressão desta banda é suprimida, uma vez que esta aparece nos demais tratamentos.

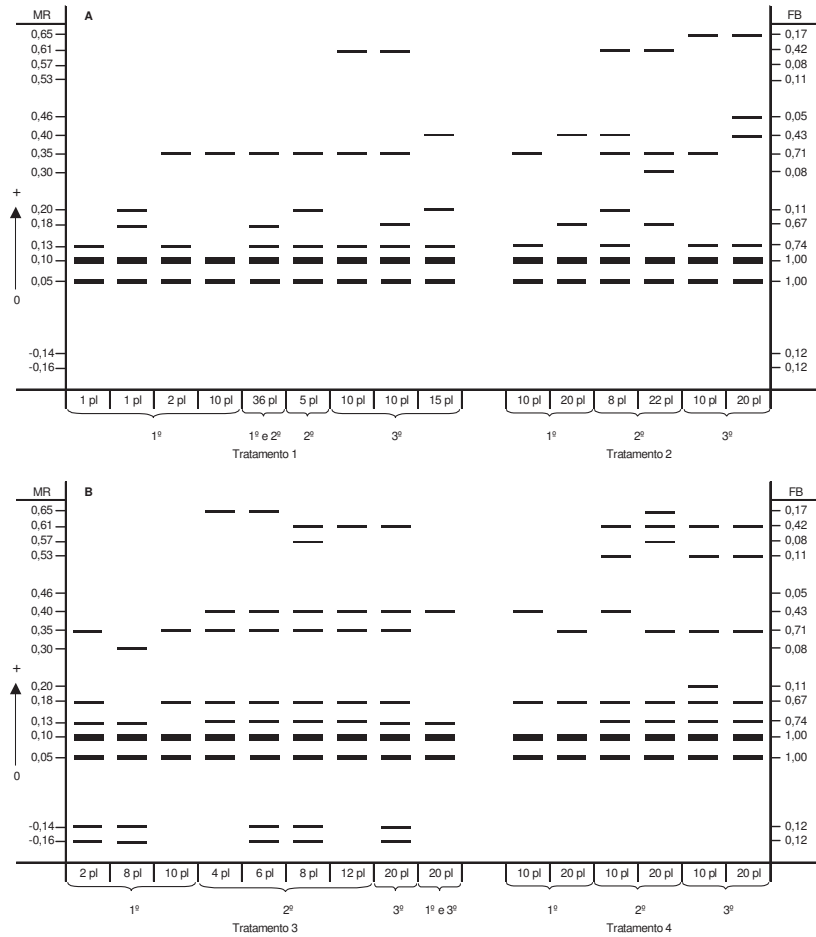


Figura 1 - Zimograma representando os 15 padrões de bandas de isoperoxidases em feijoeiro, tratamentos 1 e 2 (A) e tratamentos 3 e 4 (B), com sua respectiva migração relativa (MR), quantidade de plantas (pl) por época de coleta e frequência da banda (FB). Onde: fraca —, média —, forte —, representam a intensidade das bandas; 1º, 2º e 3º, as épocas de coleta.

O tratamento 3 foi o único que apresentou atividade da enzima na região catódica, cujas bandas tiveram MRs de -0,14 e -0,16, supondo-se que esta isoforma está associada diretamente com o desenvolvimento de indução de resistência nas plantas, conferida pelo agente biocontrolador contra infecções de Xapf acima de 5×10^4 UFCs g^{-1} de semente.

A alta atividade de isoenzimas de PO, têm sido relacionada à resistência, e algumas vezes utilizadas como marcadores bioquímicos de resistência em culturas como alface contra *Bremia lactucae* e melão contra *Pseudoperonospora cubensis* (REUVENI et al., 1992).

No tratamento 4, observou-se a presença da banda de MR 0,53 com alta atividade na 2ª e 3ª época do estádio V2. A atividade da enzima gerou uma isoforma nova, que pode ser resultado da ação do biocontrolador como indutor de resistência, indicando o momento que este pode estar induzindo a defesa da planta. Entretanto, a indução da atividade da peroxidase pode ser um mecanismo utilizado pelos vegetais para reduzir os níveis de H_2O_2 e peróxidos orgânicos formados sob diferentes condições de estresse (ROSSI & LIMA, 2001).

Nandakumar et al. (2001), observaram a presença de cinco isoenzimas de peroxidase (PO1–PO5) em plantas de arroz tratadas com uma formulação de *Pseudomonas fluorescens*, nas plantas não tratadas com a formulação e inoculadas com o patógeno, três bandas correspondentes (PO1–PO3) foram observadas. Os autores concluíram que a bactéria *Pseudomonas fluorescens* induz à resistência sistêmica

na planta, controlando o patógeno *Rhizoctonia solani*. Concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

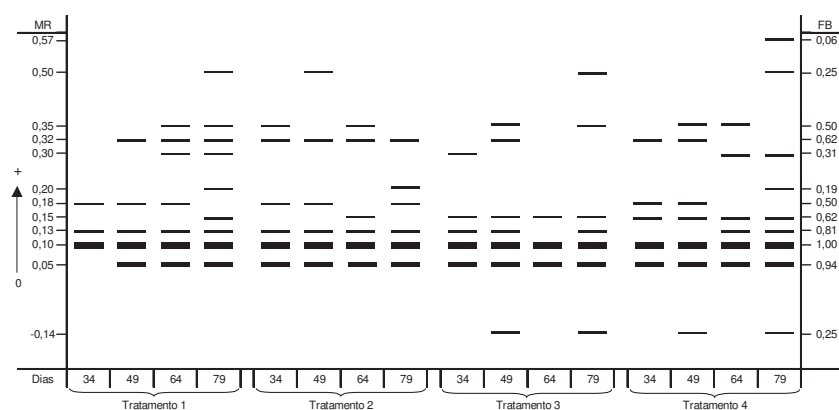
A banda de MR 0,30 apareceu no presente estudo, nos tratamentos 2 e 3, em que havia sido inoculado Xapf. Subentende-se que a presença de uma quantidade maior de Xapf, pode desencadear a ativação isoenzimática e gerar isoformas específicas frente à infecção do patógeno. Da mesma maneira, Campos et al. (2004), trabalhando com plantas de feijoeiro inoculadas com o fungo indutor *Colletotrichum lindemuthianum* e desafiadas após três dias com o patótipo virulento, apresentaram tanto nos tratamentos com indução de resistência, quanto no tratamento com o patótipo virulento, o aparecimento de uma nova banda com atividade peroxidásica, perto da linha de frente, e esta banda não aparece nas plantas sadias.

Nandakumar et al. (2001), observaram que nas plantas não tratadas com *Pseudomonas*, a indução foi mais forte apenas no estágio inicial de patogênese e simultânea ao patógeno e a atividade de isoperoxidases foi mais reduzida do que nas plantas tratadas, em que a atividade permaneceu após uma semana da inoculação com o patógeno.

De modo geral, observou-se menor atividade isoperoxidásica nos tratamentos 1, 2 e 3, principalmente na primeira época. Nos tratamentos 3 e 4, observou-se a maior atividade desta enzima nas duas últimas épocas de coleta. Esta isoperoxidase pode ser sintetizada em mínimas quantidades na planta, e com o estímulo do biocontrolador e da própria bactéria patogênica, passa a ser sintetizada *de novo*. Conforme Siegel (1993), esse aumento na atividade da enzima pode ser, provavelmente devido à síntese *de novo* da enzima.

No experimento II, as plantas foram analisadas do estágio V3 até o R6 do ciclo de desenvolvimento das plantas de feijoeiro. Foram detectadas no total 12 bandas, sendo 11 bandas anódicas que variaram de 0,05 a 0,57 e uma banda na região catódica de MR -0,14. A banda mais frequente foi a de intensidade fraca, sendo que as MRs 0,05 e 0,10 apresentaram intensidade média e forte, respectivamente. A MR 0,10 apresentou frequência da banda de 1,00 e a MR 0,57 apresentou a menor frequência da banda (0,06), conforme zimograma da Figura 2.

Figura 2 - Zimograma representando os 12 padrões de bandas de isoperoxidasases em feijoeiro ao longo do ciclo da cultura,



com sua respectiva migração relativa (MR) e frequência da banda (FB), conforme o tratamento e os diferentes dias após a semeadura. Onde: fraca —, média —, forte —, representam a intensidade das bandas.

Aos 34 dias as plantas do tratamento 1 (controle), apresentaram baixa atividade, podendo ser entendido que as isoperoxidasases, relacionadas com a defesa, ainda não estavam ativadas neste estágio. Contudo, observou-se um crescente aumento da

atividade da enzima ao longo do ciclo da cultura, com um maior aumento aos 79 dias após a semeadura.

Em relação ao tratamento 2, detectou-se que aos 34 dias as plantas já apresentaram alta atividade da enzima, comparando-se com o controle (T1), devido à quantidade de Xapf na semente ser maior, e a planta iniciar sua reação de defesa diante da presença do patógeno.

No caso do tratamento 4, observou-se alta atividade da enzima, principalmente aos 79 dias. A atividade da enzima permaneceu alta durante todo o ciclo, sugerindo-se que a planta estaria “protegida” contra o ataque severo do patógeno. Ressalta-se que a presença do agente de biocontrole induz a planta a ativar os mecanismos de defesa e não causa danos. De acordo com Gaspar et al. (1986), o aumento da atividade da peroxidase seria uma adaptação das células frente à condição de estresse.

Segundo Nandakumar et al. (2001), a detecção de grande atividade das isoenzimas de peroxidase e com similaridade de bandas em plantas tratadas e não tratadas com formulações biocontroladoras, sugere que as diferenças nas isoformas associadas com a indução de resistência são quantitativas, mas não qualitativas.

A isoforma de MR 0,20 apareceu nos tratamentos 1, 2 e 4 somente no final do ciclo, não sendo ativada no tratamento 3. No tratamento 4, observou-se a presença da isoforma de MR 0,57. A banda de MR 0,30 não foi ativada no tratamento 2. Conforme Birecka et al. (1973), a ativação das formas latentes de peroxidase, após a destruição ou inativação de inibidores protéicos ou fenólicos, pode conduzir à indução de síntese de isoformas de peroxidase.

A banda de MR -0,14, apareceu nos tratamentos 3 e 4, em que as sementes foram microbiolizadas com o biocontrolador, aos 49 e 79 dias após a semeadura. Subentende-se que o biocontrolador induziu a ativação desta isoforma independente da quantidade de Xapf presente nas sementes. Mozzetti et al. (1995), observou que plantas de pimentão imunizadas local ou sistemicamente contra diferentes patógenos, apresentavam alta ativação da PO, mesmo em plantas não desafiadas com o patógeno. Os mesmos autores afirmam que folhas de pimentão resistentes a *Phytophthora capsici* são induzidas por elicitores, incrementando ainda mais a resistência.

No experimento III, em que as plantas foram aspergidas com o biocontrolador e com água (controle-T1), apresentaram diferenças significativas antes e depois das aplicações, e poucas diferenças entre os tratamentos. Foram detectadas no total 12 padrões de bandas, sendo 11 anódicas que variaram as MRs de 0,05 a 0,57 e uma banda catódica de MR -0,14. A banda de MR 0,10 apresentou intensidade forte e a maior frequência da banda (1,00). As MRs 0,50, 0,53 e 0,57 apresentaram a menor frequência da banda (0,04), conforme zimograma na Figura 3.

Em todos os tratamentos, inclusive o controle, apresentaram variação após a aplicação do biocontrolador e da água, respectivamente. Diferente do encontrado por Ye et al. (1990), em que a atividade da peroxidase aumentou rapidamente (6-12 dias) após a inoculação de plantas de fumo com *Tobacco mosaic virus* – TMV, em comparação com a atividade de plantas controle tratadas com água, que permaneceram com o mesmo nível.

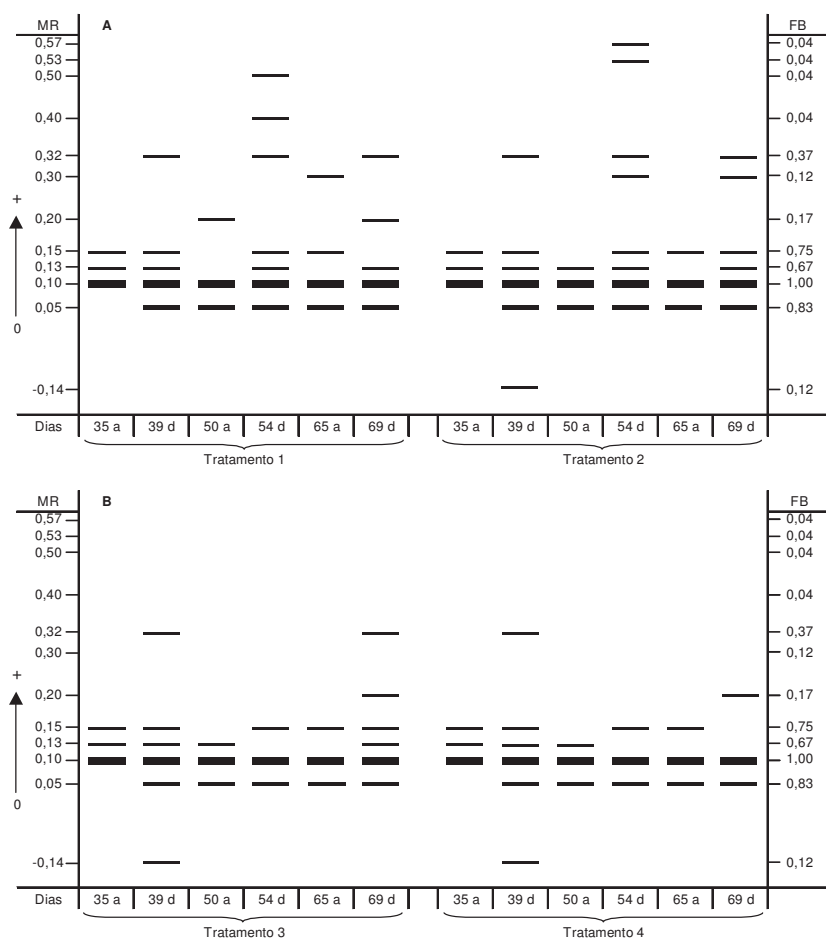


Figura 3 - Zimograma representando os 12 padrões de bandas de isoenzimas de peroxidases em feijoeiro comum, tratamento 1 e 2 (A) e tratamento 3 e 4 (B), com sua respectiva migração relativa (MR) e frequência da banda (FB), conforme os dias após a semeadura.

Onde: fraca —, média —, forte —, representam a intensidade das bandas; a, antes da aplicação e d, depois da aplicação.

A MR 0,20 não foi ativada no tratamento 2, nos demais tratamentos apresentou maior ativação aos 69 dias. Ainda no tratamento 2, estavam ativas as bandas de MRs 0,53 e 0,57. A banda de MR -0,14, apareceu nos tratamentos 2, 3 e 4, logo após a aplicação com o biocontrolador, indicando que a planta é induzida a ativar esta isoforma.

No tratamento 4, em que foram feitas três aplicações com o biocontrolador, a atividade da enzima somente foi aumentada depois da primeira aplicação, indicando não haver necessidade de mais de uma aplicação. Em comparação com tratamento 3, em que se realizaram duas aplicações, a atividade da enzima foi semelhante para os dois casos. No entanto, no tratamento 3 aos 69 dias ocorreu alta atividade.

As poucas diferenças observadas entre os tratamentos podem ser explicadas pelo fato do agente biocontrolador ser uma bactéria nativa do solo e não apresentar mecanismo de entrada na parte aérea da planta ou mesmo não adaptar-se a fitosfera. No caso de aplicação foliar, algumas plantas podem não tolerar a presença de microrganismos que liberam substâncias na parede celular, levando a planta a desencadear mecanismos de defesa. Também deve-se levar em consideração o fato da fitotoxicidade da formulação na área foliar da planta. Entretanto, outros ensaios devem ser conduzidos visando explorar novos aspectos que confirmem estas observações, assim como estudar o possível envolvimento de substâncias produzidas pelo agente de biocontrole no filoplano, que possam ter papel na indução de resistência e no controle de patógenos.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- a) O biocontrolador possibilita o aumento da atividade de enzimas relacionadas com a defesa como isoenzimas de peroxidase, sugerindo que este, tem ação direta e indireta na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum contra Xapf.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aplicação profilática com o biocontrolador, nas sementes, demonstra ser uma estratégia de controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, em testes realizados em condições controladas.

O biocontrolador com actinomiceto demonstra ter um futuro promissor como agente de biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* agente causal do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, por reduzir significativamente a incidência e a severidade da doença.

O biocontrolador exerce efeito sobre enzimas envolvidas no estado de indução de resistência em plantas de feijoeiro, desencadeando mecanismos de defesa contra o patógeno, indicando que este tem ação como indutor biológico de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, V. A. *Detecção e biocontrole de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli var. fuscans (Smith) Dye em sementes de feijoeiro comum (Phaseolus vulgaris L.)*. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. 4. ed. Florida EUA: Universidade da Florida, 1997.

ALFENAS, A. C. et al. Extração de proteínas para eletroforese. In: ALFENAS, A. C. *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins - fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos*. Viçosa: UFV, 1998. p. 85-114.

AZEVEDO, L. A. S. *Manual de quantificação de doenças de plantas*. São Paulo, 1998.

BARACAT-PEREIRA, M. C. et al. Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenase: presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 39, p. 91-98, 2001.

BEUX, E.; DENARDIN, N. D. Uso de bactérias antagonistas no controle “in vitro” de *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34., 2001, São Carlos-SP. *Resumos...* Piracicaba: SBF, 2001. p. 303.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al. *Manual de Fitopatologia*. 4º ed. São Paulo: Ceres, 2005. p. 333-349. v.2.

BINDSCHEDLER, L. F. et al. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1357-1376, 2002.

BIRECKA, H.; BRIBER, K. A.; CATALFAMO, J. L. Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in

relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. *Plant Physiology*, v. 52, p. 43-49, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-253, 1976.

BRAMMER, S. P. *Mapeamento de genes de resistência parcial à ferrugem da folha do trigo em cultivares brasileiras de trigo (Triticum aestivum L.)*. 2000. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BRAMMER, S. P.; et al. *Identificação de marcadores isoesterásico associado ao gene Lr24 com resistência à ferrugem da folha em trigo*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. 12 p. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online, 13). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_ci13.htm.

BURDON, J. J.; MARSHALL, D. R. The use of isozymes research. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Ed.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding: part A*. Amsterdam: Elsevier Science, 1983. p. 401-412.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CARUSO, C. et al. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry*, v. 58, p. 743-750, 2001.

CHEN, C. et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 56, n. 1, p. 13-23, 2000.

CNPMA (Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente). *Jornal do Endofítico*. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/mat_invitro.html >. Acesso em: 20 abril 2004.

COLSON, E.; DEVERALL, B. Helping plants fight their own disease battles. *Australian Cottongrower*, v.17, p. 76-80, 1996.

COMISSÃO ESTADUAL DE PESQUISA DE FEIJÃO – CEPEF. *Indicações Técnicas para a Cultura do Feijão no Rio Grande do Sul 2003/04*. Passo Fundo: UPF, 2003.

CORNÉ, M. J. et al. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação para uma defesa refinada. In: LUZ, W. C. et al. (Org.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 13, p. 277-295, 2005.

COVENTRY, H. S.; DUBERY, I. A. Lipopolysaccharides from *Bulkholderia cepacia* contribute to an enhance defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotianae tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 58, p. 149-158, 2001.

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

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculantes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 16, n. 3, p. 215-217, 2000.

DIAZ, C. G. *Avaliação de danos causados por Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. 2000. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, 2000.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. *Produção de feijão*. Guaíba: Agropecuária, 2000.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, v. 64, p. 351-359, 1999.

FODOR, J.; JOZSA, A.; KIRALY, Z. Systemic acquired disease resistance in plants. *Novenyvedelem*, v. 34, p. 117-126, 1998.

GASPAR, T. et al. Two-step control of basic and acidic peroxidase and its significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, v. 64, p. 418-423, 1986.

GHAOUTH, A. E.; WILSON, C. L.; CALLAHAN, A. M. Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology*, v. 93, p. 349-355, 2003.

GILBERTSON, R. L.; MAXWELL, D. P. Common blight of bean. In: CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHYAY, A. N. (Eds.) *Plant diseases of international importance*. Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ, v. 2, 1992. p. 18-39.

GÖKMEN, V. et al. Study of lipoxygenase and peroxidase as blanching indicator enzymes in peas: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *LWT*, v. 38, p. 903-908, 2005.

GOTTLIEB, L. D. Conservation and duplications of isozymes in plants. *Science*, v. 216, p. 373-380. 1982.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 387-412, 1996.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; SOUSA, R. M. de. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. *Ciência Agrotécnica*, v. 24, p. 94-102, 2000.

_____. *Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura*. 2002. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

IBGE. *Levantamento da produção de feijão safra 2004/05*. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 14 dez. 2005.

JOHANSSON, P. M.; JOHNSON, L.; GERHARDSON, B. Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. *Plant Pathology*, v. 52, p. 219-227, 2003.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v. 60, p. 969-976, 1970.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, v. 39, p. 83-89, 2003.

KEMP, G. et al. Disease development and β -1,3-glucanases expression following leaf rust infection in resistant and susceptible near-isogenic wheat seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, p. 45-52, 1999.

KLOPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. *BioScience*, v. 46, p. 406-409, 1996.

KOCH, W.; WAGNER, C.; SEITZ, U. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta*, v. 206, p. 523-532, 1998.

LABANCA, E. R. G. *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus) contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LEE, S. H.; KIM, E. S.; LEE, M. Y. Purification and characterization of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. *Phytochemistry*, v. 58, p. 859-864, 2001.

LI, L.; STEFFENS, J. C., Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, v. 215, p. 239-247, 2002.

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

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, v. 85, p. 1064-1068, 1995.

LUZ, W. C. História da Micologia e Importância dos Fungos. In: LUZ, W. C. et al. (Org.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 1 ed., v. 13, 2005. p. 1-30.

LYON, G. D.; REDLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to “immunize” plants against infection. *Plant Pathology*, v. 44, p. 407-427, 1995.

MARTINEZ, C. et al. Apoplastic Peroxidase Generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 11, n. 11, p. 1038-1047, 1998.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. *Annals of Botany*, v. 82, p. 535-540, 1998.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Controle Biológico*. v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4., 1996, Gramado, RS. *Anais...* 1996. p. 3-23.

MÉTRAUX, J. P. et al. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, v. 250, p. 1004-1006, 1990.

_____. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 13-18, 2001.

MORAES, M. G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: LUZ, W. C. et al. (Orgs.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 6, 1998. p. 261-284.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MOROHASHI, Y.; MATSUSHIMA, H. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, n. 349, p. 1381-1387, 2000.

MOURA, A. B. et al. Testagem em casa-de-vegetação, em infectário e em campo, da eficiência de actinomicetos pré-selecionados como agentes de biocontrole da murcha bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 21, p. 337, 1996. (Abstract).

MOZZETTI, C. et al. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspension as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 46, p. 95-107, 1995.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 33, p. 603-612, 2001.

NASSER, L. C. B. *Procedimentos para coleta e remessa de sementes e plantas para diagnóstico de doenças em laboratórios de fitopatologia*. Guia técnico do produtor rural, nº 44. Embrapa Cerrados, Planaltina. 1999. 2 p.

NOJOSA, G. B. A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, n. 2, p. 148-154, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology*, v. 115, p. 165-172, 1986.

QUIROGA, M. et al. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, v. 122, p. 1119-1127, 2000.

RAVA, C. A. Crestamento Bacteriano Comum. In: ZIMMERMANN, M. J.; ROCHA, M.; YAMADA, T. *Cultura do feijoeiro – fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p. 528-541.

REUVENI, R. et al. Peroxidase activity as a biochemical marker for resistance of muskmelon (*Cucumis melo*) to *Pseudoperonospora cubensis*. *Phytopathology*, v. 82, p. 749-753, 1992.

ROMEIRO, R. da S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa: UFV, 1995.

_____; MOURA, A. B.; MATSUOKA, K.; FERNANDES, M. C. Actinomycetes selected for biocontrol of tomato wilt (*Ralstonia solanacearum*) and growth promotion after seed microbialization. *Phytopathology*, v. 87, p. 83-97, 1997.

_____. *Indução de resistência em plantas e patógenos*. Viçosa: UFV, 1999.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. *Scientia Agricola*, v. 58, n. 1, p. 197-199, 2001.

RYALS, J. A. et al. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SAETTLER, A. W. Common Bacterial Blight. In: HALL, R. (Ed.) 2. ed. *Compendium of bean disease*. St. Paul: APS Press, 1991. p. 29-30.

SÁNCHEZ, E. et al. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 27, p. 973-978, 2000.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry*, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, 1998.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Crestamento bacteriano comum. In: _____. (Eds.). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 217-242.

_____; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAUJO, S. A. et al. (Ed.). *A cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: POTAFOS, 1996. p. 669-722.

_____. *Principais doenças do feijoeiro comum*. Disponível em : <http://www.agromil.com.br/doe_feij.html>. Acesso em: 27 jul. 2004.

SBALCHEIRO, C. C.; BRAMMER, S. P.; BARCELLOS, A. L. Variabilidade isoesterásica associada a genes de resistência à ferrugem da folha do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 267-273, 2005.

SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics*, v. 3, p. 37-79, 1969.

_____. Control of gene expression and enzyme differential. In: _____. *Physiological genetics*. New York: Academic Press, 1979.

SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases - an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, v. 12, p. 303-312, 1993.

SILVA, L. H. C. P. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. 2002. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2002.

SPERS, E. E.; NASSAR, A. M. Competitividade do sistema agroindustrial do feijão. In: FARINA, E. M. M. Q.;

ZYLBERSZTAJN, D. (coord.). *Competitividade do agrobusiness brasileiro*. São Paulo: PENSA, 1997. p. 102-250.

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

SUJKOWSKI, L. S. et al. Antibiotic producing strain of *Erwinia herbicola* as a potential control agent for *Alternaria solani*. *Phytopathology*, v. 84, p. 1982, 1994 (Abstr).

TAIZ, L. & ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TON, J. et al. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 15, p. 27-34, 2002.

TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGGLER, S. P. *Isoenzimas – variabilidade genética em plantas*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. Inoculação artificial de sementes de feijão com *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e seu efeito sobre a qualidade sanitária e germinação. *Summa Phytopatológica*, v. 17, p. 227-231, 1991.

_____; MENTEN, J. O. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: método para detecção em sementes de feijão. *Fitopatologia Brasileira*, v.17, p. 373-383, 1992.

_____. Detecção do agente causal do crestamento bacteriano comum em sementes de feijão. In: _____. *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p. 53-54.

VAN LOON, L.C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, v. 12, p. 245-264, 1994.

_____; BAKKER P. A. H. M.; PIETERSE C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 453-483, 1998.

_____; 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*, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DEN BOVENKAMP, G. W.; BIRNBAUM, Y. Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. *Seed Science and Technology*, v. 11, p. 547-559, 1983.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 45, p. 472-489, 1995.

VENETTE, J. R.; LAMEY, H. A. *Dry Edible Bean Diseases*. Disponível em <http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsciraucrops>. Acesso em 10 dez. 2005.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M. A. P. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 273-349.

WALLEN, V. R.; SUTTON, M. D. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. On field bean in Ontario. *Canadian Journal of Botany*, v. 43, p. 437-446, 1965.

WELLER, D. M.; SAETTLER, A. W. Evaluation of seed-borne *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blights. *Phytopathology*, v. 70, p. 148-152, 1980.

WRIGHT, S. A. I.; BEER, S. V. *Pantoea agglomerans* como agente de biocontrole do “fogo bacteriano”. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 13, p. 247-276, 2005.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, n. 3, p. 428-435, 1999.

YAHRAUS, T. et al. Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiological*, v. 109, n. 4, p. 1259-1266, 1995.

YE, X. S.; PAN, S. Q.; KUÉ, J. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidases as related to systemic resistance of tobacco to Blue Mold (*Peronospora tabacina*) and to Tobacco mosaic virus. *Phytopathology*, v. 80, n. 12, p. 1295-1299, 1990.

YUEN, G. Y. et al. Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*, v. 20, p. 395-402, 2001.

ZHAO, H. et al. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 44, p. 36-40, 2005.