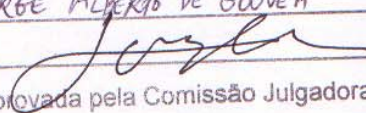


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

JORGE ALBERTO DE GOUVÊA

**EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL
NAS RESPOSTAS DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO AO
*Southern bean mosaic virus***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
JORGE ALBERTO DE GOUVÊA

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal, na área
de Fisiologia Vegetal.

Orientador Prof. Dr. Jorge Vega

Campinas, 2006

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	TIUNICAMP
	G745e
V.	Ed.
TOMBO BC/	71916
PROC.	16.145-07
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	03/04/07
BIB-ID	406648

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G745e

Gouvêa, Jorge Alberto de

Efeito de reguladores de crescimento vegetal nas respostas hipersensível e suscetível de cultivares de feijoeiro ao *Southern Bean Mosaic Vírus* (Sobemovirus) / Jorge Alberto de Gouvêa. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Jorge Vega.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Brassinosteróides. 2. Ácido salicílico. 3. Fenilalanina amônia-liase. 4. Peroxidases. I. Vega, Jorge. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effect of plant growth regulators on hypersensitive and susceptible responses of bean cultivars to infection by *Southern Bean Mosaic Vírus* (Sobemovirus).

Palavras-chave em inglês: Brassinosteroids; Salicylic acid; Phenylalanine Ammonia-Lyase; Peroxidases.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Jorge Vega, Cláudia Regina Baptista Hadad, Célia Regina Baptista Gras, Marcelo Carnier Dórenlas, Jorge Alberto Marques Rezende.

Data da defesa: 28/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 28 de Agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Jorge Vega (Orientador)


Assinatura

Professora Dr^a. Claudia Regina Baptista Haddad


Assinatura

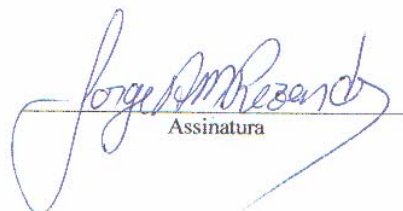
Professora Dr^a. Célia Regina Baptista Grassi


Assinatura

Professor Dr. Marcelo Carnier Dornelas


Assinatura

Professor Dr. Jorge Alberto Marques Resende


Assinatura

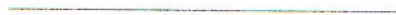
Professor Dr. Ladaslav Sodek


Assinatura

Professora Dr^a. Marlene Aparecida Schiavinato


Assinatura

Professor Dr. Jose Alberto Caram de Souza Dias


Assinatura

Dedico esta tese à minha mãe, **Maria Teresinha Albuquerque de Gouvêa**
e ao meu pai, **Jorge Alberto Brandão de Gouvêa** (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Jorge Vega, agradeço pela orientação serena, conhecimento, paciência dedicada e pela amizade.

Aos meus pais, Jorge Alberto Brandão de Gouvêa (*in memorian*) e Maria Teresinha Albuquerque de Gouvêa, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos professores Cláudia, Marcelo, Célia e Jorge Rezende pela análise prévia do trabalho e pelas valiosas sugestões.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia Vegetal pela atenção e auxílio prestados ao longo dos trabalhos.

Aos funcionários Dulce, Dulcinéia, Denise, Domingos, Carlos e Paiola pelo profissionalismo dedicado e pela amizade.

À secretária da FV Lorenza e aos funcionários da Secretaria da Pós Graduação, especialmente a funcionária Roseli.

Aos demais colegas do Departamento de Fisiologia Vegetal pela convivência amigável, em especial à Sandra e sua família.

À agência de pesquisa CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Resistência e Mecanismos de Resistência de Plantas Contra Patógenos.....	3
1.2.	Mecanismos Bioquímicos de Resistência.....	5
1.3.	Proteínas protetoras.....	9
1.4.	O Papel do Ácido Salicílico na HR e na SAR.....	11
1.5.	Brassinosteróides e o seu papel na defesa vegetal.....	14
1.6.	Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos Estados Unidos.....	18
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1.	Objetivos gerais.....	20
2.2.	Objetivos específicos.....	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1.	Material Vegetal.....	21
3.2.	Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos EUA.....	22
3.3.	Preparo dos extratos e inoculação do SBMV.....	22
3.4.	Reguladores de crescimento e preparo das soluções.....	22
3.5.	Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local (HR)...	23
3.5.1.	Efeito de reguladores de crescimento no número de lesões necróticas em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculado com SBMV.....	23
3.5.2.	Efeito de reguladores de crescimento na atividade de peroxidases em plantas de feijoeiro Moruna (nc).....	24
3.5.3.	Efeito de reguladores de crescimento na evolução da atividade das peroxidases e no número de lesões necróticas em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV.....	24
3.5.4.	Efeito de reguladores de crescimento na atividade da L-fenilalanina amônia-liase (PAL) e no número de lesões necróticas em feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV.....	25
3.6.	Atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL).....	26
3.7.	Atividade de Peroxidases (POX).....	27
3.8.	Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência sistêmica adquirida.....	27

3.8.1.	Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral de plantas de feijoeiro Jalo infectadas com o SBMV.....	28
3.8.2.	Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral e na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV.....	29
3.9.	Testes Serológicos.....	30
4.	RESULTADOS.....	32
4.1.	Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local em feijoeiro Moruna (nc).....	32
4.1.1.	Efeito de reguladores de crescimento no número de lesões necróticas	32
4.1.2.	Efeito de reguladores de crescimento na atividade de guaiacol-peroxidases.....	33
4.1.3.	Efeito de reguladores de crescimento na evolução da atividade das guaiacol-peroxidases e no número de lesões necróticas.....	33
4.1.4.	Efeito de reguladores de crescimento na atividade da L-fenilalanina amônia-liase (PAL) e no número de lesões necróticas.....	36
4.2.	Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência sistêmica.....	38
4.2.1.	Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral de plantas em de feijoeiro Jalo infectadas com o SBMV.....	38
4.2.2.	Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral e na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV.....	40
5.	DISCUSSÃO.....	43
5.1.	Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral e na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV ...	44
5.2.	Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV.....	52
6.	CONCLUSÕES.....	56
7.	LITERATURA CITADA.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

APX = Ascorbato Peroxidase

AS = Ácido salicílico

BL = Brassinolídeo

BR 16 = Brassinolídeo (BIOBRÁS-16)

CAT = Catalase

g-POX = Guaiacol-peroxidase

GPX = Glutathione Peroxidase

GR = Glutathione Redutase

HR = Hypersensitive response

ISEM = Immuno Sorbent Electron Microscopy

PAL = L-fenilalanina amônia-liase

POX = Peroxidase

PTA-ELISA = Plate Trapped Antigen – Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

ROS = reactive oxygen species

SAR = Systemic acquired resistance

SBMV = *Southern bean mosaic virus*

ScYLV = *Sugarcane yellow leaf virus*

SOD = Superóxido Dismutase

SuCMoV = *Sunflower chlorotic mottle virus*

TMV = *Tobacco mosaic virus*

WCMV = *White clover mosaic virus*

EFEITO DE REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL NAS RESPOSTAS DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO AO *Southern bean mosaic virus*

RESUMO

A aplicação de determinados reguladores de crescimento em plantas pode resultar na indução de resistência contra ataques subseqüentes de patógenos. Este fenômeno é conhecido como resistência sistêmica adquirida (SAR) e vários mecanismos estão envolvidos, entre eles a resposta de hipersensibilidade (HR), o aumento na atividade das enzimas peroxidases (POX) e da fenilalanina amônia-liase (PAL) nos tecidos resistentes. A fim de se determinar o efeito do ácido salicílico (AS) e de um brassinolídeo (BR 16) na resposta hipersensível, plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Moruna (nc) foram tratadas com estes reguladores de crescimento e inoculadas com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV). Determinou-se o número de lesões necróticas das folhas primárias e a atividade das enzimas guaiacol peroxidases (g-POX) e PAL. Houve uma redução significativa no número de lesões necróticas nas plantas tratadas com ambos os reguladores de crescimento e um aumento significativo na atividade das g-POX, mas nenhum efeito na atividade da PAL. O efeito da aplicação de AS e BR 16 na resposta suscetível foi verificado através da aplicação destes reguladores de crescimento em plantas de feijoeiro da cultivar Jalo, inoculadas com o SBMV. Os tratamentos promoveram uma redução significativa na concentração viral na 5ª folha trifoliolada, 28 dias após a inoculação das folhas primárias. Os resultados indicam que as aplicações de ácido salicílico e do brassinolídeo BR 16 podem ter promovido uma indução de resistência tanto local quanto sistêmica, em plantas de feijoeiro. O aumento na atividade das enzimas g-POX, envolvidas nos processos de detoxificação de espécies reativas de oxigênio, promovido pelo

tratamento com ambos os reguladores de crescimento, sugere uma participação destas na redução do número de lesões necróticas das plantas inoculadas com o SBMV.

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON RESPONSES OF BEAN CULTIVARS TO *Southern bean mosaic virus*

SUMMARY

The use of certain growth regulators in plants can result in the induction of resistance against attacks of some plant pathogens. This phenomenon is known as Systemic Acquired Resistance (SAR) and several mechanisms are involved in the induction of SAR, among them are the Hypersensitive Reaction (HR), the increase in the activity of some enzymes like peroxidases (POX) and Phenylalanine ammonia-lyase (PAL).

Two different growth regulators (salicylic acid “SA” and a brassinosteroid “BR 16”) were used in order to determine the induction of local resistance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) of cultivar Moruna (nc). After the application, the plants were mechanically inoculated with *Southern bean mosaic virus* (SBMV), genus *Sobemovirus*. The number of necrotic lesion was determined in the the primary leaves and the activity of the enzymes guaiacol peroxidases (g-POX) and Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) were also measured. There was a significant reduction in the number of necrotic lesions in the treated plants with both growth regulators and a significant increase in the activity of the g-POX, but there was no effect in the PAL activity. The effect of the application of SA and BR 16 in the induction of systemic resistance was verified through the application of these growth regulators in bean plants cultivar Jalo, inoculated with SBMV. The treatments promoted a significant reduction in the viral concentration in the 5th leaf, 28 days after the inoculation of the primary leaves. The results indicated that the applications of SA and of the BR 16 promoted both local and systemic resistances. The increase in the activity of the guaiacol peroxidases, enzymes involved in the scavenging of reactive oxygen species, caused by the treatment with both

growth regulators, suggested a contribution in the reduction of the number of necrotic lesions in the plants inoculated with SBMV. The use of SA and BR 16 did not change the activity of PAL, enzyme involved in the lignification process and in the mechanisms of plant defense against infections.

1. INTRODUÇÃO

O controle fitossanitário sempre foi objeto de grande preocupação para a humanidade, demandando grandes esforços contra as doenças das plantas cultivadas, gerando altos custos energéticos, econômicos e ambientais. Apesar dos resultados obtidos no controle de doenças infecciosas, advindos das tecnologias atuais, permanece a necessidade da busca por soluções mais eficientes com menor risco e custo. Além disso, a demanda crescente por alimentos e energia de biomassa, assim como a importância que o agronegócio adquiriu na economia nacional, através das commodities agrícolas com maior circulação internacional, são todos fatores que pressionam para o aumento da produção e da produtividade agrícola. No Brasil, a resposta a esta demanda tem sido um incremento na produtividade acompanhada de um avanço das áreas cultivadas com monoculturas. A cultura da soja, por exemplo, registrou um aumento na taxa média anual de crescimento da área plantada de 3,6% no período 1990-2000 para nada menos do que 13,8% entre 2000-2004 (Brandão *et al.*, 2005). A mesma perspectiva de expansão ocorre para a cana-de-açúcar em função da demanda por combustíveis renováveis, bem como para outras culturas. Entretanto, o cultivo de espécies geneticamente uniformes em áreas cada vez mais extensas, leva com frequência à uma quebra da resistência genética das plantas pelos patógenos, causando epidemias com perdas no rendimento, qualidade e na segurança dos produtos. O uso de cultivares resistentes é o método de controle preferido por ser o mais barato e o de mais fácil utilização. Entretanto, a prática da monocultura requer novas cultivares resistentes em períodos cada vez mais curtos, dificultando os programas convencionais de melhoramento de plantas (introdução de genes mendelianos) (Kegler & Spaar, 1993). Para contornar as falhas de resistência das culturas, os agricultores utilizam em maior escala e de forma continuada o controle químico convencional, favorecendo o surgimento de patógenos resistentes aos defensivos agrícolas, com elevação de

custos e da necessidade constante de se encontrar novos princípios ativos. Situações mais graves podem ocorrer sob condições de ambiente extremamente favorável aos patógenos e plantas hospedeiras altamente susceptíveis. Nestas situações, mesmo com o emprego de agroquímicos, é possível não se obter o nível desejado de controle das doenças. Por outro lado, cresce a exigência por parte dos consumidores por produtos com maior qualidade, produzidos em sistemas agrícolas sustentáveis e livres de resíduos agroquímicos.

Neste contexto, em que se revela a importância da busca permanente por novas medidas de proteção das plantas contra doenças, se destaca o conceito de indução de resistência em plantas, que pode ser definido como a ativação de mecanismos latentes de resistência de uma planta (Hammerschmidt & Dann, 1997). Como esta resistência ocorre naturalmente nas interações entre planta e patógeno, é possível interferir, de forma que estes mecanismos próprios sejam deflagrados e utilizados em escala comercial (Pascholati, 2003).

Embora os mecanismos próprios de defesa das plantas sejam conhecidos há mais de um século, apenas nos últimos anos houve um grande aumento no volume de pesquisas envolvendo a indução de resistência a doenças de plantas. Concomitantemente ocorreu o surgimento de novos produtos comerciais ativadores de resistência que apresentam alta eficiência, estabilidade e menor impacto ao ambiente (Cavalcanti, 2003). Estes avanços recentes no entendimento de como as plantas respondem aos ataques dos patógenos ocorreram em função da aplicação de novas ferramentas de pesquisa na biologia celular, usadas em pesquisas bioquímicas, genéticas e da biologia molecular. Entretanto, muitos aspectos da indução de resistência em plantas ainda não estão completamente compreendidos, como por exemplo, a contribuição individual dos mecanismos de resistência ativados, o fenômeno de reconhecimento dos agentes indutores pelas células vegetais e de como ocorre a sinalização das células do sítio de infecção para os demais tecidos, nas respostas sistêmicas.

Mais recentemente, algumas revisões têm sido feitas demonstrando a participação de reguladores de crescimento nos sistemas de defesa das plantas contra patógenos (Fraser & Whenham, 1982; Whenham and Fraser; 1990; Jameson & Clarke, 2002). Entretanto, ainda se faz necessária a compreensão do papel destes reguladores de crescimento, tanto na determinação objetiva de quais reguladores participam na ativação dos mecanismos de resistência contra os patógenos, quanto na forma de como estas substâncias atuam nos diferentes mecanismos de defesa vegetal.

1.1. Resistência e Mecanismos de Resistência de Plantas Contra Patógenos

As plantas estão sujeitas ao ataque de uma variedade de patógenos e para assegurar a sobrevivência, ao longo da evolução, elas desenvolveram mecanismos de resposta às doenças infecciosas que são acionados assim que reconhecem a agressão. Cada interação hospedeiro-patógeno pode ser vista como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência (Dianese, 1990). De um lado, o patógeno lança mão de suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, a fim de estabelecer a infecção. Do outro lado, o hospedeiro, através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura se defender do patógeno (Bostok & Stermer, 1989). Desta forma, o conceito de resistência de um hospedeiro pode ser definido como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (Pascholati & Leite, 1994).

Na natureza as reações de incompatibilidade são freqüentes e a resistência das plantas é a regra. Para que ocorra compatibilidade e as infecções sejam efetivadas com sucesso é necessário que o patógeno vença os mecanismos de resistência do hospedeiro, também denominados de fatores de resistência. Os mecanismos de resistência são geralmente

subdivididos em duas categorias: pré-formados (constitutivos) e pós-formados (induzíveis). Em ambos, ocorrerão fatores de resistência estruturais e bioquímicos.

As estruturas de resistência (pré ou pós-formadas), que funcionam dentro do conjunto dos mecanismos de resistência, agem como barreiras físicas e inibem o patógeno desde a sua entrada até sua dispersão dentro da planta. A cutícula, os estômatos e tricomas já estão na planta antes mesmo da infecção pelo patógeno se constituem, portanto, em estruturas de resistência pré-formadas ou constitutivas. Por estarem localizadas na superfície são consideradas como a primeira linha de defesa das plantas contra os patógenos. Entre as estruturas de resistência pós-formadas ou induzíveis, estão o espessamento da parede celular ou lignificação, a formação de tiloses, papilas, halos e a deposição de gomas.

Os fatores de resistência bioquímicos (pré ou pós-formados) agem produzindo substâncias que são tóxicas ou inibem o crescimento do patógeno. Dentre as substâncias pré-formadas ou constitutivas, estão os compostos fenólicos, os alcalóides, as lactonas insaturadas, terpenóides, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos e fototoxinas. De uma forma geral, essas substâncias estão presentes em altas concentrações nos tecidos sadios da planta e, em alguns casos como resultados da infecção, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Já os fatores de resistência bioquímicos pós-formados ou induzíveis, estão ausentes ou presentes em pequenas concentrações antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Como exemplo deste tipo de mecanismo de resistência induzido está a Reação ou Resposta de Hipersensibilidade (“Hypersensitive Response”-HR). A HR na sua forma clássica mostra-se como uma pequena necrose visível a olho nu, que ocorre em diferentes órgãos da planta, sendo considerada como sinônimo de morte celular ou de necrose do tecido (Király, 1980; Goodman *et al.*, 1986). Na prática a HR se caracteriza por restringir o crescimento e/ou dispersão do patógeno (Durner *et al.*, 1997) ocorrendo poucas horas após o ataque deste

(Agrios, 1998). Outros exemplos de mecanismos bioquímicos de resistência induzidos são a produção de fitoalexinas, quitinases, β -1-3-glucanases, inibidores protéicos, proteases e proteínas relacionadas com a patogênese (“Pathogenesis Related Proteins”-PR). Nesses processos, existe a participação de várias enzimas, dentre elas, as peroxidases que participam de inúmeras vias metabólicas (Gaspar *et al.*, 1991).

Desta forma, compreende-se que a resistência das plantas contra os patógenos é um sistema multicomponente, formado de um número de mecanismos (constitutivos e induzidos), operando de maneira coordenada e integrada, sendo que a eficiência desta resistência será determinada pela soma das contribuições individuais de cada fator de resistência.

1.2. Mecanismos Bioquímicos de Resistência

Os mecanismos estruturais de resistência fornecem à planta vários níveis de defesa contra o ataque de patógenos. Entretanto, as pesquisas científicas mostram que, na maior parte das interações planta-patógeno, as substâncias produzidas pelas células do hospedeiro, por meio dos mecanismos bioquímicos de defesa, antes ou após o contato do patógeno, são provavelmente os verdadeiros responsáveis pela resistência à infecção das plantas contra certos patógenos (Pascholati & Leite, 1994). Dentre estes mecanismos bioquímicos de resistência, destaca-se o mecanismo de Reação de Hipersensibilidade (HR), uma resposta de defesa induzida pelo patógeno. Este tipo de reação ocorre em função do reconhecimento da infecção por parte do hospedeiro, como consequência da incompatibilidade entre a planta e o patógeno (Doke *et al.*, 1987), comumente determinada por um único gene dominante presente na planta (Dawson & Hilf, 1992). Em seu trabalho pioneiro, Harold H. Flor (1942) propôs a existência de um sistema de reconhecimento gene-a-gene, com interação específica: uma planta com o gene dominante de resistência *R* reconhece um patógeno com o gene dominante

de avirulência *Avr*. A presença destes genes gera uma incompatibilidade entre planta e patógeno e a doença não ocorre (Resende *et al.*, 2003). A infecção por patógenos avirulentos induz à uma série de respostas de defesa freqüentemente resultando no colapso localizado de células vegetais conhecido como reação de hipersensibilidade (Stakawicz *et al.*, 1995). Esta reação resulta no rápido surgimento de lesões necróticas restritas ao sítio de ataque, claramente delimitadas por tecido saudável e, mesmo que parte dos tecidos seja danificada, a morte localizada de células contribui para a limitação da dispersão do patógeno (Keen, 1990). Este fenômeno foi comparado com a morte celular programada e a apoptose em células animais (Guo *et al.*, 1998). Desta forma, a reação de hipersensibilidade mostra-se como uma resposta celular extrema por parte da planta, podendo levar a um alto grau de resistência à doença e, por essa razão é considerada um dos mecanismos mais importantes de resistência das plantas. No caso de infecções causadas por vírus, haverá a necessidade de um vetor ou outros agentes de transmissão, que o coloquem em contato direto com as células da planta. Este é o caso das plantas de feijoeiro Moruna (“necrotic” nc), quando inoculadas com o vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos Estados Unidos (“*Southern bean mosaic virus*”-SBMV) (Cupertino *et al.*, 1982). Neste caso a HR resulta na formação das chamadas lesões locais, nas quais as partículas virais ficam restritas à algumas células, podendo sobreviver por algum tempo porém impedidas de invadir outros tecidos.

Vários processos característicos da resposta de hipersensibilidade parecem envolver primeiramente a ativação de componentes pré-existentes, ao invés de ocorrer mudanças na expressão gênica. Um desses processos é a rápida liberação de formas ativas de oxigênio (“Reactive Oxygen Species”-ROS). Na reação de hipersensibilidade, ocorre um “surto oxidativo” (“oxidative burst”) que precede e posteriormente acompanha a morte das células da planta hospedeira associadas à lesão (Mehdy, 1994). As células vizinhas do local de infecção sintetizam uma série de compostos tóxicos formados pela redução do oxigênio molecular,

incluindo o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($OH^\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O processo inicia-se pela produção de O_2^- , que provavelmente envolve uma oxidase NADP-dependente, localizada na membrana plasmática. Estes ânions superóxido são produzidos do lado externo das células e geralmente convertidos em H_2O_2 , uma molécula que pode atravessar a membrana plasmática e dentro da célula ser convertida em $OH^\bullet$ (Buchanan, 2000). Estas espécies reativas de oxigênio são tóxicas, pois podem reagir indiscriminadamente com os componentes celulares em uma cascata de reações oxidativas que resultam na quebra de DNA, degradação de proteínas, pigmentos, peroxidação de lipídeos de membranas e inativação de enzimas (Lamb & Dixon, 1997). As espécies reativas de oxigênio podem participar na defesa contra os processos infecciosos de várias formas: contribuindo para a morte celular como parte da resposta de hipersensibilidade; atacando diretamente os organismos patogênicos; agindo indiretamente ao deter a invasão subsequente através de uma rápida ligação cruzada entre várias glicoproteínas ricas em prolina e hidroxiprolina com os polissacarídeos da matriz da parede celular ou, aumentando a formação de polímeros de lignina da parede celular através do incremento da atividade de enzimas peroxidases. Também existe forte evidência indicando o surto oxidativo, que ocorre imediatamente à infecção pelo patógeno, como sendo o gatilho responsável pela resposta de hipersensibilidade (Low & Merida, 1996).

De acordo com os trabalhos de Alvarez *et al.*, (1998), o desenvolvimento da HR, uma resistência local ativada no sítio de infecção, inicialmente desencadeada pela presença de ROS, promove o estabelecimento gradual da resistência sistêmica adquirida ("Systemic acquired resistance"-SAR). Muitas vezes, quando uma planta sobrevive ao ataque de um patógeno, ocorre um aumento na sua resistência a infecções subseqüentes por uma grande variedade de patógenos, em qualquer outra região da planta, sendo esta proteção eficaz por várias semanas variando conforme a espécie vegetal. Desta forma, a resistência induzida é um termo geral, através da qual, todos os tipos de respostas eliciadas nas plantas levam à um

aumento da proteção contra doenças - incluindo resistência induzida localmente ou sistemicamente (Hammerschmidt *et al.*, 2001).

A SAR foi primeiro descrita por Gilpatrick e Weintraub (1952) (Pennazio & Roggero, 1998). A primeira evidência convincente de que as plantas podem desenvolver a SAR ocorreu em fumo. A inoculação do patógeno *Peronospora tabaciana* no caule induziu nas folhas situadas acima do sítio de infecção, resistência contra o míldio causado pelo mesmo patógeno (Cruickshank & Mandryk, 1960). O estudo do fenômeno recebeu um impulso decisivo graças aos trabalhos de Ross & Bozart (1960) e foi objeto de muitas revisões: Ross (1961; 1966), Loebenstein (1972), van Loon, (1983), Fraser (1985), Withe & Antoniow (1991). A SAR refere-se a um sinal de transdução próprio, que desempenha importante papel na habilidade das plantas em defenderem-se contra patógenos. Após a lesão local necrótica típica da resposta de hipersensibilidade, a SAR pode ser ativada, e tal ativação resulta no desenvolvimento de resistência de amplo espectro, e pela planta toda (Neuenschwander *et al.*, 1995). Até o momento, as pesquisas com SAR foram conduzidas em mais de 20 espécies e a SAR foi mais bem caracterizada em fumo e pepino (Kuc & Strobel, 1992).

Da mesma forma que o surto oxidativo parece ser o gatilho responsável pela resposta de hipersensibilidade, o fenômeno da morte celular decorrente da HR, pode disparar uma larga série de mecanismos de defesa incluindo a resistência sistêmica adquirida (Sandermann, 2000). A SAR, portanto, protege a planta contra dispersões sistêmicas do patógeno invasor e requer a expressão de genes de defesa nos tecidos saudáveis da planta. Embora as espécies reativas de oxigênio sejam importantes nas interações iniciais entre planta e patógeno, as células saudáveis dos tecidos não infectados precisam se proteger dos efeitos colaterais advindos da liberação de ROS das lesões locais, para que a resistência sistêmica se desenvolva e a planta sobreviva. (Clarke *et al.*, 2002).

1.3. Proteínas protetoras

A evolução do metabolismo aeróbico levou à uma indesejada produção de formas reativas de oxigênio em processos como a respiração e a fotossíntese, em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Estas espécies reativas de oxigênio são subprodutos formados durante sucessivos passos na redução do O_2 molecular, resultado do metabolismo aeróbico, que em condições normais se encontram em baixas concentrações na célula. Para reduzir os danos causados pela presença de ROS, as plantas desenvolveram mecanismos celulares complexos, que incluem a síntese de anti-oxidantes como o ascorbato e a glutathione, e um aumento na atividade de enzimas como ascorbato peroxidase (APX) e glutathione peroxidases (GPX), peroxidases (POX), glutathione reductase (GR), catalases (CAT) e superóxido dismutases (SOD) (Smirnoff, 1996). A SOD atua como a primeira linha de defesa contra as ROS, dismutando o íons superóxido O_2^- em H_2O_2 . As enzimas CAT, APX, GPX e outras peroxidases (POX) catalizam a quebra de H_2O_2 em H_2O e O_2 . As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas largamente distribuídas dentro do Reino Vegetal e fazem parte de um grupo de proteínas não estruturais presentes na parede celular. Atuam nos mecanismos de crescimento da célula vegetal e participam junto com outras enzimas como a PAL (EC 4.3.1.5 “Phenylalanine Ammonia Lyase”) e a CAD (EC 1.1.1.195 “Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase”) da biossíntese de lignina. A lignificação tem sido associada com a atividade de peroxidases específicas da parede celular. Existem duas hipóteses associando o aumento da atividade das peroxidases no processo de lignificação da parede celular com o impedimento da infecção por um determinado patógeno. Uma propõe que a lignificação da parede celular no sítio de ataque do patógeno poderia torná-la mais resistente à dissociação pelas enzimas do fungo e a outra sugere que os compostos fenólicos precursores de lignina poderiam apresentar atividades anti-fúngicas. Vários grupos têm demonstrado em infecções virais o aumento na

atividade das peroxidases que utilizam peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como um substrato para as ligações cruzadas da parede celular (Lagrimi & Rothstein 1987, Moshatti *et al.*, 1993, Montalbini *et al.*, 1995).

O aumento na atividade de POX causado por infecções virais tem sido relacionado com os mecanismos de defesa associados à reação de hipersensibilidade. Plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Moruna nc, inoculadas com o vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos EUA (“*Southern bean mosaic virus*”- SBMV), apresentaram um aumento na atividade das POX dois dias após a inoculação, ou seja, antes do aparecimento das lesões necróticas (Rocha, 2000). No entanto, também as infecções com invasão do tipo sistêmica podem promover um aumento na atividade de peroxidases. Foi verificado um aumento da atividade de peroxidases associado à infecções sistêmicas em plantas de feijoeiro da variedade Top Crop, infectadas com isolado de potexvirus que não forma lesões, chamado de mosaico do trevo branco (“*White clover mosaic virus*” -WCIMV) (Clarke *et al.*, 2002). Eles verificaram a atividade de enzimas envolvidas na detoxificação das ROS, onde as atividades de CAT, GR e SOD declinaram rapidamente após a infecção enquanto atividade de POX foi aumentada em plantas inoculadas. Invasões sistêmicas em monocotiledôneas também resultaram em um aumento atividade das POX. Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) infectadas pelo *Sugarcane yellow leaf virus*, apresentaram uma atividade de POX 50% maior que as sadias (Scagliusi *et al.*, 2003).

A L-fenilalanina amônia liase (PAL) é considerada uma enzima chave na biossíntese de compostos fenólicos uma vez que catalisa a desaminação redutiva da L-fenilalanina para formar o ácido trans-cinâmico, a primeira etapa na biossíntese de compostos como fenilpropanóides em plantas. Estes compostos incluem a formação de lignina, flavonóides e ácidos hidroxicinâmicos (Morelló *et al.*, 2005). A atividade da PAL varia com o estágio de desenvolvimento da planta e com a diferenciação celular e dos tecidos. Também pode variar

em resposta a vários estresses, tais como irradiação, ferimentos, deficiência nutricional, herbicidas e ataques de patógenos, os quais aumentam a síntese da PAL ou a sua atividade. O envolvimento da PAL na resistência sistêmica adquirida foi demonstrado através do trabalho de Mauch-Mani & Slusarenko (1996), no qual plantas do gênero *Arabidopsis* tornaram-se suscetíveis a fungos anteriormente avirulentos quando a atividade da enzima PAL foi especificamente inibida. A resistência das plantas pôde ser restabelecida através de tratamento com ácido salicílico (“salicylic acid”-SA) exógeno. Uma vez que a PAL catalisa o primeiro passo da biossíntese de ácido salicílico (AS), o aumento na suscetibilidade é provavelmente causado por um bloqueio na síntese de AS. De forma mais específica, a biossíntese de ácido salicílico inicia-se com a conversão da L-fenilalanina ao ácido trans-cinâmico (t-CA), uma reação catalisada pela PAL. Tem sido proposto que a conversão de t-CA em ácido salicílico provém da produção de ácido benzóico, seguida pela hidroxilação do carbono 2, para derivar em ácido salicílico (Yalpani *et al.*, 1993).

1.4. O Papel do Ácido Salicílico na HR e na SAR

O ácido salicílico (AS) (Figura 01) é um dos vários compostos fenólicos, definidos como compostos encontrados nas plantas contendo um anel aromático com um grupo hidroxila ou seus derivativos. A sua biossíntese e metabolismo foram bem caracterizados, sendo que a síntese ocorre a partir do ácido *trans*-cinâmico via ácido benzóico, uma reação catalizada pelo ácido benzóico 2-hidroxilase (BA2H) (Jameson & Clarke, 2002).

Apenas recentemente houve evidências de que o AS possui papel de regulador único e específico. A primeira sugestão de que o AS estaria envolvido na defesa de plantas foi formulada por White (1979), que injetando aspirina ou AS em folhas de fumo, verificou um

aumento na resistência contra infecções subseqüentes ao vírus do mosaico do fumo (“*Tobacco mosaic virus*” TMV) (Klessig & Malamy, 1994).

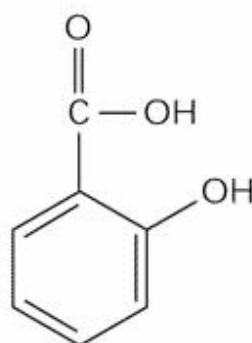


Figura 01: Ácido Salicílico

A reação de hipersensibilidade causada pelo ataque de um vírus incompatível a uma planta, inicia a ativação da SAR através de um sinal transmitido do sítio de infecção para os tecidos saudáveis. A ativação de genes específicos na SAR pode estar associada a um mensageiro secundário, mas nenhum sinal ou mensageiro é conhecido. Entretanto um grande número de evidências sugere que o AS desempenha uma importante função na transdução de sinais na SAR (Pennazio & Roggero, 1998). Inicialmente foi observado que o nível de AS aumentou centenas de vezes em plantas de fumo e pepino após a infecção como vírus TMV, e este aumento demonstrou estar correlacionado com a SAR (Métraux *et al.*, 1990; Malamy *et al.*, 1990; Rasmussem *et al.*, 1991; Enyedi *et al.*, 1992; Uknes *et al.*, 1992). No processo da resistência sistêmica adquirida ocorre acúmulo de AS, sendo que algumas formas estão inertes na forma glicosilada (Shualev *et al.*, 1995). Após a segunda inoculação do vírus, chamada de inoculação de desafio, as formas glicosiladas inertes de AS podem ser rapidamente liberadas como formas livres de AS (Takahashi *et al.*, 1997; Lee & Raskin, 1998). Outras evidências do papel do AS na transdução de sinais na SAR indicam que tecidos tratados com AS adquirem

resistência (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1993); plantas transgênicas que expressam salicilato hidroxilases (que previnem a síntese de AS) não adquirem resistência e não acumulam RNAs vinculados à SAR (Lawton *et al.*, 1995).

Uma possível forma de ação do AS na transdução de sinais foi proposta por Chen *et al.* (1993), onde a ligação do AS com uma isoforma da CAT inibiria a atividade desta enzima com um conseqüente aumento nos níveis de H₂O₂. Uma vez que o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar a membrana plasmática, este funcionaria como um mensageiro secundário do AS. Entretanto, outros resultados contrapõem-se a esta possibilidade (Vernooij *et al.*, 1994; Neuenschwander *et al.*, 1995). Sendo assim, Durner & Klessig (1995) sugeriram que o mecanismo pelo qual o AS induz as respostas de defesa não seria através do aumento dos níveis de H₂O₂ e sim, através de radicais livres de ácido salicílico, gerados como subprodutos das interações dele com as enzimas CAT ou POX.

Por outro lado, ratificando os resultados obtidos por Chen *et al.* (1993), Arias *et al.*, 2003 relacionam o AS com a repressão de atividade de enzimas anti-oxidantes, com o acúmulo de peróxido de hidrogênio, com a sinalização e com queda na concentração de vírus em infecções sistêmicas. Estes resultados foram obtidos trabalhando-se com duas linhagens susceptíveis (L2 e L33) de girassol (*Helianthus annuus* L.) infectadas sistemicamente pelo potyvirus “*Sunflower chlorotic mottle virus*” (SuCMoV). As linhagens apresentavam diferenças na intensidade e na taxa de desenvolvimento das infecções, sendo a L2 mais susceptível que a L33. Foi verificado que na L33, mais resistente, após a inoculação e antes do surgimento dos sintomas, ocorreu um acúmulo de H₂O₂. Isto contrastou com a L2 que apresentou um aumento na atividade de enzimas anti-oxidantes e somente após o surgimento das lesões cloróticas gerou acúmulo de H₂O₂. A aplicação de ácido salicílico antes da inoculação na L2, gerou uma reação similar à L33, prevenindo o aumento da atividade das enzimas anti-oxidantes e promovendo o acúmulo de H₂O₂, antes do aparecimento das cloroses,

e causou ainda uma queda na concentração do SuCMoV. Isto sugere que o aumento na atividade de enzimas anti-oxidantes interrompe os sinais gerados pelo incremento de ROS, que poderiam disparar reações de defesa no hospedeiro. Enquanto o papel do AS como um componente necessário para a SAR é geralmente aceito, a possibilidade de ser um sinal de longa distância entre o sítio de infecção e a resposta sistêmica permanece em debate (Pennazio & Roggero, 1998). Mais recentemente foi demonstrado que, após infecções por patógenos em plantas, ocorre o aumento em paralelo, tanto do AS quanto de um metil-éster volátil do AS (metilsalicilato), que teriam implicações na comunicação interna da planta e entre plantas (Shulaev *et al.*, 1997).

1.5. Brassinosteróides e o seu papel na defesa vegetal

Hormônios esteróides são reguladores bem conhecidos em sistemas animais, entretanto, a comprovação da existência de hormônios esteróides desenvolvendo funções no desenvolvimento e na fisiologia de plantas é relativamente recente. No início dos anos 70 John Mitchell e colaboradores do Departamento de Pesquisa Agrícola dos estados Unidos (USDA) iniciaram uma triagem em grãos de pólen de plantas do gênero *Brassica*, em busca de novos hormônios vegetais. Em 1972 Mitchell e Gegory demonstraram o efeito das brassinas (mistura de lipídeos purificada do pólen de colza, *Brassica napus*) no aumento do rendimento de plantas e no vigor de sementes (Arteca, 1995). Posteriormente foi identificado um brassinolídeo (BL) como o composto ativo das brassinas (Figura 02).

A ocorrência de BLs e seus congêneres parece ser ubíqua e já foram isolados em mais de 50 espécies vegetais (Fujioka, 1999). Até o momento, mais de 60 compostos já foram identificados e são coletivamente denominados brassinosteróides (BRs), sendo a castasterona, um precursor direto do BL, o BR mais comum. Os brassinosteróides têm sido encontrados em

todos os órgãos de plantas testados, apresentando altos teores em tecidos jovens em crescimento quando comparados com tecidos mais maduros. As concentrações mais altas são encontradas em pólen e sementes imaturas (Baiguz & Tretyn, 2003).

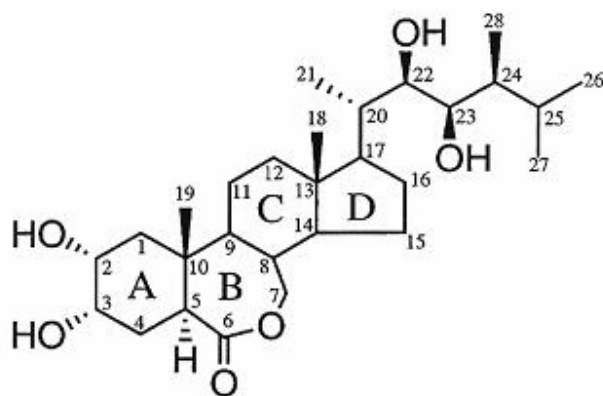


Figura 02: Brassinolídeo.

De forma semelhante aos esteróides em animais, a estrutura dos BRs consiste de um esqueleto de colesterol com várias substituições de hidroxila e grupos funcionais ligados. A intensidade das respostas eliciadas por um dado composto depende das alterações presentes nestes grupos funcionais (Brosa, 1999; Back & Pharis 2003). Os BRs são necessários para o crescimento normal das plantas, a deficiência na biossíntese ou na percepção destes hormônios implica em plantas anãs, tipicamente verde-escuras apresentando epinastia nas folhas com reduzida ou nenhuma fertilidade e retardo do desenvolvimento (Bishop & Koncz 2002). Os brassinosteróides representam a nova sexta classe de hormônios em plantas com larga ocorrência no reino vegetal (Bajguz & Tretyn, 2003) sendo que a síntese dos BRs pelas plantas deve ocorrer a partir de outros de seus fitosteróides, como sitosterol e campesterol (Zullo & Adam, 2002). Estudos com cultura de células de *Catharanthus roseus* sugerem que a

partir do campesterol ocorrem duas rotas de biossíntese dos BRs, que podem se inter cruzar implicando em que não sejam completamente autônomas (Fujioka & Yokota, 2003).

Embora BRs compartilhem similaridades com hormônios esteróides animais, em termos de estrutura e requerimento para o desenvolvimento normal, existem diferenças na função e no modo de ação. No modelo clássico em animais, esteróides lipofílicos difundem-se através da membrana plasmática e se ligam com receptores específicos localizados no citosol ou no núcleo. Esta ligação induz à uma mudança conformacional em que o complexo ligante/receptor segue para ligar-se ao DNA e modificar a expressão genética diretamente em um período de horas ou até mesmo dias (Lüsel & Wehling 2003). Segundo Haubrick & Assmann (2006), o genoma de *Arabidopsis* não contém seqüências diretamente homólogas para receptores de esteróides nucleares animais e desta forma, a percepção dos BRs poderia ocorrer na membrana plasmática e ter os seus efeitos mediados pela transdução de sinais em cadeia.

As funções dos BRs em plantas têm sido intensivamente estudadas nos últimos anos. Além dos efeitos no crescimento e desenvolvimento em plantas, os BRs foram associados à indução da síntese de etileno (Yi *et al.*, 1999) e na proteção das plantas contra salinidade, calor, seca e frio (Mazorras *et al.*, 2002), sugerindo que os BRs possuem uma função na resposta contra diferentes tipos de estresses. Entretanto, os mecanismos pelos quais os BRs modulam as respostas a estes estresses não estão compreendidos. Um mecanismo que pode estar envolvido na resistência a várias formas de estresse é o incremento na atividade de enzimas anti-oxidantes. A aplicação de duas formas de brassinosteróides em discos foliares de plantas de tomateiro, acarretou um aumento na atividade da SOD, POX e CATs, em resposta ao calor, para os dois tipos de BRs (Mazorras *et al.*, 2002). O papel dos BRs na defesa das plantas contra patógenos também está sendo investigado. A aplicação tópica de BRs indicou uma ação protetora contra fungos, porém este efeito foi dependente das concentrações bem

como do método e do momento da aplicação (Khripach *et al.*, 2000). Um trabalho realizado por Nakashita *et al.* (2003) demonstraram que a aplicação de BL induziu resistência contra vários patógenos em mono e dicotiledôneas. Foi verificado que plantas de fumo tratadas com BL apresentaram um aumento na resistência contra o *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Pseudomonas syringae* pv. Tabaci (Pst) e *Oidium* spp., e contra *Magnaphorte grisea* e *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzae em plantas de arroz. O tratamento simultâneo de plantas com BL e indutores de SAR resultou em um efeito de proteção adicional contra o ataque de patógenos. Eles observaram ainda que a indução da resistência promovida pelo BL funciona independentemente do AS e de forma diferente da resistência decorrente da SAR.

Uma intrigante conexão entre BRs e sinalizadores de ferimentos foi encontrada em tomateiro. Um peptídeo específico de solanáceas, a sistemina, é liberada após o ataque de insetos ou herbívoros. Um receptor da sistemina, o SR 160, foi clonado após a purificação e se revelou idêntico a um putativo receptor de BR no tomateiro, o tBRI1 (Scheer & Ryan 2002; Montoya *et al.*, 2002). A ligação de BR com o tBRI1 não foi demonstrada, sendo sugerido por Szekeres *et al.* (2003) que a castasterona e não o BL seria o responsável pela sinalização de BR em plantas de tomateiro. Níveis detectáveis de BL não são tipicamente encontrados em tomate, embora estudos recentes tenham encontrado BL no pericarpo de tomates no amadurecimento (Montoya *et al.*, 2005). Muitos trabalhos têm demonstrado o papel dos BRs, sozinhos ou em associações com outros hormônios vegetais em processos como alongamento celular ou germinação. Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre o papel dos BRs em respostas fisiológicas específicas como a resistência contra o ataque de patógenos.

Os efeitos das infecções viróticas na biossíntese e metabolismo de hormônios vegetais são extremamente complexos. De uma forma simples, é possível descrever as infecções virais como alterações na quantidade de um hormônio em particular e, com frequência, os sintomas induzidos por vírus podem ser repetidos através da aplicação ou remoção de um dado

hormônio vegetal (Jameson & Clarke, 2002). Desta forma, para o desenvolvimento de novos métodos de controle de doenças que utilizam a ativação dos mecanismos de defesa vegetal, é fundamental o entendimento dos fenômenos biológicos envolvendo reguladores de crescimento na indução de resistência em plantas, contra patógenos, tanto para o desenvolvimento de expressões constitutivas de resistência quanto para o uso de novos produtos ativadores de resistência.

1.6. Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos Estados Unidos

A produção mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é da ordem de 18,9 milhões de toneladas. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão com uma produção em 2005/2006 estimada em 3,2 milhões de toneladas, em 4.034 ha com um rendimento médio de 808 kg/ha, segundo dados da CONAB (2006). A cultura do feijoeiro possui um grande valor social no Brasil, pois é a base da alimentação da população como fonte de proteína vegetal de baixo custo.

A produtividade da cultura é grandemente afetada por doenças e, aquelas causadas por vírus representam um dos principais fatores associados às perdas na América Latina e no Brasil, tanto pela redução da produtividade e qualidade, quanto pela dificuldade de seu controle (Costa, 1987). No Brasil, foram descritas mais de dez viroses em feijoeiro (Costa *et al.*, 1972; Bianchini *et al.*, 1997), citando-se entre elas as causadas pelo vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos EUA (*Southern bean mosaic virus* - SBMV), gênero *Sobemovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Este vírus tem uma gama restrita de hospedeiras, confinada quase que exclusivamente a espécies da família das leguminosas. Foi primeiramente relatado infectando feijoeiro no Distrito Federal, ocasionando sintomas de mosaico fraco a severo, deformação da vagem e distorção foliar (Cupertino *et al.*, 1982) e, posteriormente foi

encontrado no Estado de São Paulo (Costa, 1987). O SBMV possui partículas isométricas (28-30 nm) contendo RNA genômico de 4-4,5 Kb com polaridade positiva e proteína capsial com massa molecular de 29-30 kDa (Shepherd, 1971; Sehgal, 1981).

De uma forma geral, algumas infecções causadas por vírus podem induzir resistência em determinadas plantas. Resistência aqui compreendida como qualquer inibição da replicação e/ou dispersão viral na planta, que não é hereditária, mas apresenta certas vantagens como especificidade viral e nenhum efeito colateral no genótipo da planta (Pennazio & Roggero, 1998). A inoculação de plantas de feijoeiro com SBMV é uma associação prática e de fácil execução, desta forma, esta combinação se constitui em um modelo experimental importante e eficiente para se investigar indução de resistência em plantas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Verificar o efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local e sistêmica em plantas de feijoeiro inoculadas com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV).
- Investigar o efeito da aplicação de reguladores de crescimento na atividade de enzimas envolvidas nos processos de defesa local e sistêmica, em plantas de feijoeiro sadias e infectadas pelo SBMV.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar o efeito da aplicação de AS e BR 16 na indução da resposta de defesa local, através da determinação do número de lesões necróticas (HR), em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com o SBMV.
- Avaliar o efeito da aplicação de AS e BR 16 na atividade das enzimas gPOX e PAL, em plantas de feijoeiro Moruna (nc), sadias e inoculadas com o SBMV.
- Analisar o efeito da aplicação de AS e BR 16 na indução da resistência sistêmica adquirida (SAR), através da determinação da concentração viral, em infecções sistêmicas de plantas de feijoeiro Jalo, infectadas pelo SBMV.
- Estudar o efeito da aplicação de AS e BR 16 na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo sadias e infectadas pelo SBMV.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Duas cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foram utilizadas para os testes de indução de resistência. As plantas da cultivar Moruna (nc), que apresentam a reação de hipersensibilidade (HR) característica em resposta a infecções pelo SBMV, foram utilizadas nos experimentos do efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local. As sementes foram cedidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, Estado de São Paulo. Como modelo para o estudo de indução de resistência sistêmica adquirida, foram utilizadas plantas de feijoeiro da cultivar Jalo, susceptível a infecções sistêmicas pelo SBMV, que causa nesta variedade um mosaico discreto e o enrugamento nas folhas.

3.2. Vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos EUA

Um isolado do *Southern bean mosaic virus* (SBMV) (Figura 3). O vírus foi obtido na UNESP/São José do Rio Preto e cedido para o Departamento de Fisiologia Vegetal do IB-UNICAMP, pelo professor Dr. José Osmar Gaspar. O vírus purificado foi utilizado nas primeiras inoculações e depois nos padrões de concentrações virais dos testes serológicos. Posteriormente foi perpetuado em plantas de feijoeiro da cultivar Jalo, cujo extrato das folhas das plantas infectadas constituiu-se na fonte de inóculo para as demais infecções.

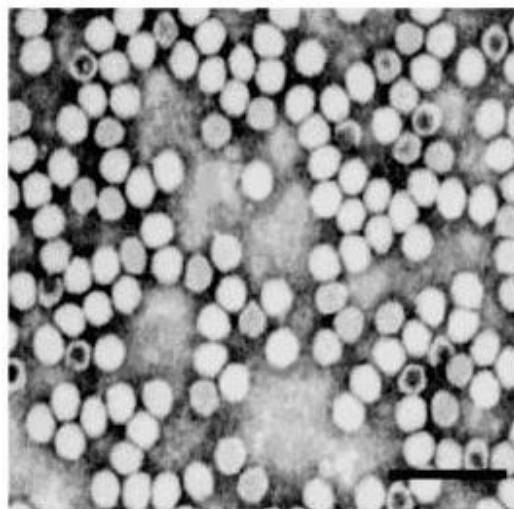


Figura 3. Micrografia eletrônica de partículas do SBMV, a barra representa 100 nm.
Fonte: Moreira A. E. & Gaspar J. O. - IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto/SP.

3.3. Preparo dos extratos e inoculação do SBMV

Os extratos de fitovírus utilizados nas inoculações das plantas durante os experimentos foram preparados a partir de 1 g de folhas de feijoeiro Jalo, infectadas com o SBMV, maceradas em 10 mL de tampão fosfato de potássio (20 mM KH_2PO_4), adicionado de 25 mg de sulfito de sódio (20 mM de Na_2SO_3) como antioxidante e, pH ajustado para 7,0 (KOH). Em todos os ensaios as inoculações foram realizadas mecanicamente na face adaxial das folhas primárias, através do espalhamento manual suave do extrato de fitovírus de folhas de feijoeiro infectadas e utilizando carborundum como agente abrasivo.

3.4. Reguladores de crescimento e preparo das soluções

Para avaliar o efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local e sistêmica em plantas de feijoeiro inoculadas com SBMV, foi utilizado o ácido salicílico,

produto comercial Sigma-Aldrich, e um análogo espiroestânico de brassinoesteróide (BR 16), o BIOBRAS-16. Composto sintetizado em Cuba e cedido pela Dra. Miriam Núñez Vázquez, do Departamento de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, do Instituto Nacional de Ciências Agrícolas de San José de las Lajas, La Habana. Em todos os ensaios a aplicação dos reguladores de crescimento foi exógena, sendo as soluções aspergidas sobre as plantas através de borrifadores manuais. As soluções de AS foram feitas na concentração de 5 mM (Hooft van Huijsduijnen *et al.*, 1986; Rocha, 2000), ajustado para pH 7,0 com KOH. A concentração de BR 16 utilizada foi de 0,1 mg/L (Núñez *et al.*, 2003). O melhor efeito biológico destas concentrações foi confirmado em testes prévios de concentrações para os dois reguladores de crescimento utilizados. Em todas as soluções preparadas foi adicionado TWEEN 20 (Polioxietilensorbitano – Monolaurato) como emulsificante, na concentração de 0,1%.

3.5. Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local (HR)

3.5.1. Efeito de reguladores de crescimento no número de lesões necróticas em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculado com SBMV

Sementes de feijoeiro da variedade Moruna (nc), que apresenta lesões locais em resposta à infecção com SBMV, foram postas para germinar em copos plásticos de 700 mL com substrato vermiculita e irrigadas com solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). As plantas foram mantidas em casa de vegetação até a completa expansão das folhas primárias e então transferidas para câmara de crescimento com 360 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), fotoperíodo de 12 horas, e temperatura constante de 25°C $\pm 2^\circ\text{C}$. Após a expansão completa da primeira folha trifoliolada, as plantas foram aspergidas com soluções de AS (5 mM), BR 16 (1 mg/mL) e com água como controle. Conforme

metodologia utilizada por Rocha (2000), um dia após a aplicação dos reguladores de crescimento, as plantas foram inoculadas com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV), conforme o item 3.3. A estabilização do número de lesões locais, decorrentes da reação de hipersensibilidade em resposta ao SBMV, ocorreu seis dias após a inoculação. As folhas primárias foram então coletadas e a área foliar individualmente determinada, através de integralizador eletrônico marca Licor, modelo Li-3100. A seguir, o número total de lesões de cada folha foi contado, com auxílio de uma lupa, para se obter o número de lesões por cm².

3.5.2 Efeito de reguladores de crescimento na atividade de peroxidases em plantas de feijoeiro Moruna (nc)

Em outro ensaio com plantas da variedade Moruna (nc), as sementes foram postas para germinar em copos plásticos de 700 mL com substrato vermiculita e irrigadas com solução completa de Hoagland, as plantas foram cultivadas conforme descrito no item 3.5.1. Após a completa expansão da primeira folha trifoliolada, as plantas foram aspergidas com soluções de AS (5 mM), BR 16 (1 mg/mL) e água como controle. Um dia após a aplicação dos reguladores de crescimento, as folhas primárias de todos os tratamentos foram coletadas para a determinação da atividade das enzimas guaiacol-peroxidases (g-POX).

3.5.3 Efeito de reguladores de crescimento na evolução da atividade das peroxidases e no número de lesões necróticas em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV

Um experimento com plantas de feijoeiro Moruna (nc) foi executado para avaliar o efeito da aplicação de reguladores de crescimento na evolução da atividade da guaiacol-

peroxidase (g-POX), em plantas inoculadas e não inoculadas com o SBMV. Sementes de feijoeiro Moruna (nc) foram postas para germinar em vasos de 2 L, com substrato vermiculita e cultivadas conforme o item 3.5.1. Após a expansão completa da primeira folha trifoliolada, as plantas foram organizadas em dois grupos, que receberam os mesmos tratamentos hormonais. Em ambos os grupos, as plantas foram aspergidas com soluções de AS (5 mM) ou com BR 16 (1 mg/mL) e com água como controle. Entretanto, apenas um dos grupos foi inoculado com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV), de forma que os tratamentos se constituíram em Água; AS; BR 16; Água + SBMV; AS + SBMV e BR 16 + SBMV. A inoculação foi realizada 24 horas após a aplicação dos reguladores de crescimento, conforme o item 3.3. Tanto nas plantas sadias quanto nas plantas inoculadas, foram avaliadas as atividades das peroxidases POX (EC 1.11.1.7), nas folhas primárias, no 2º, 4º, 6º e 8º dia após a aplicação dos reguladores de crescimento. Nas plantas inoculadas, as folhas primárias tiveram o número total de lesões necróticas determinado em dois momentos, no 4º e no 8º dia após a aplicação dos reguladores de crescimento, que correspondem, portanto, ao 5º e 7º dias após a inoculação, respectivamente. O número de lesões por cm² foi obtido através da determinação individual da área foliar das folhas primárias, através de integralizador eletrônico e da contagem do número total de lesões por folha.

3.5.4. Efeito de reguladores de crescimento na atividade da L-fenilalanina amônia-liase (PAL) e no número de lesões necróticas em feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV.

Para avaliar o efeito da aplicação dos reguladores de crescimento na atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL), em plantas inoculadas e não inoculadas, foi realizado um experimento com plantas de feijoeiro Moruna (nc), executado de forma idêntica à descrita

anteriormente (item 3.4.3). Além da avaliação da atividade da PAL, também foi determinado o número de lesões necróticas nas folhas inoculadas, conforme descrito no item 3.5.1. Neste experimento, a coleta das folhas primárias para todos os testes foi realizada no 5º dia após a inoculação. A seguir foram realizados os testes enzimáticos de atividade da PAL nas folhas primárias de todos os tratamentos.

3.6. Atividade da Fenilalanina amônia-liase (PAL)

A atividade da enzima PAL (E.C.4.3.1.5.) foi determinada de acordo com modificações do método descrito por Pascholati *et al.* (1986). A extração das enzimas foi feita a partir de 1g de tecido das folhas. As amostras foram então maceradas a 4°C, em 5 mL de tampão borato de sódio (H₃BO₃ Sigma) 100 mM, pH 7,0; contendo 0,1 g de polivinil-pirolidona (PVPP). Após a homogeneização, a emulsão foi centrifugada a 20.800 g, em centrífuga Beckman modelo J2-21 (rotor JA21, 13.500 rpm) ajustada para 4°C, por 35 minutos. Do sobrenadante foram retirados 3 mL e adicionados 0,45 g de polietilenoglicol (PEG-8000 Sigma) para a precipitação da proteína. Após uma hora de descanso com o PEG a 4°C o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores por 30 minutos, onde o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de tampão borato de sódio 100 mM, com pH ajustado para 8,8 com KOH. Essa fração foi usada para a avaliação da atividade enzimática. O meio de reação foi composto por 0,8 mL do extrato da amostra, 1,0 mL do tampão borato 100 mM, pH 8,8 e 1,0 mL de L-fenilalanina 12 mM, no mesmo tampão. Como branco foram utilizados 0,8 mL do extrato da amostra e 2,0 mL de tampão borato pH 8,8. A atividade da PAL foi determinada a 40°C através de medida espectrofotométrica da conversão da L-fenilalanina para ácido-transcinâmico em 290 nm, e foi expressa em relação à massa fresca (μmol/min.g).

3.7. Atividade de Peroxidasas (POX)

As análises para a determinação de peroxidasas (EC 1.11.1.7) foram feitas seguindo protocolo descrito por Peyrano *et al.* (1997) com algumas modificações. Os ensaios foram feitos através da oxidação do substrato guaiacol que detecta todas as isoformas de peroxidasas (Goldberg *et al.*, 1983). As amostras de folhas foram maceradas a 4°C em 50 mM de tampão fosfato a pH 6,0, na proporção 1,0 g de tecido para 5,0 mL de tampão. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado nos ensaios enzimáticos. O meio de reação para determinar a atividade da guaiacol-peroxidase foi composto de 5 mM de guaiacol (Sigma), 5 mM de H₂O₂ (Merck) e 50 mM de tampão fosfato (NaH₂PO₄) pH 6,0 (NaOH). Para cada 3,0 mL do meio de reação, foram adicionados 30 µL do extrato foliar. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, sendo a leitura feita a cada 10 segundos, por um período de 3 minutos.

3.8. Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência sistêmica adquirida

3.8.1 Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral de plantas de feijoeiro Jalo infectadas com o SBMV

Foi executado um experimento em casa de vegetação, com semeadura em 10 de Maio e a coleta do material realizada em 26 Junho de 2004 (tabelas de temperaturas no anexo I). Neste ensaio, sementes de feijoeiro da cultivar Jalo, susceptíveis a infecções sistêmicas pelo SBMV, foram postas para germinar em vasos de 5 L com substrato vermiculita e irrigadas

com solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Após a completa expansão da primeira folha trifoliolada, foram realizadas três aplicações nas plantas, em intervalos de 4 dias, com soluções de AS (5 mM), BR 16 (1 mg/mL) ou borrifadas com água, como controle. Um dia após a primeira aplicação dos reguladores de crescimento, as folhas primárias foram inoculadas da mesma forma que o cultivar Moruna (item 3.3). Nas plantas aspergidas com água um grupo foi inoculado e outro não, de forma que os tratamentos se constituíram em Água (plantas sadias), Água+SBMV, AS+SBMV e BR 16+SBMV. A Tabela 1 apresenta a disposição em que o conjunto dos tratamentos foi organizado.

Tabela 01. Composição dos tratamentos de efeito de reguladores de crescimento em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV. ASx3 = ácido salicílico aplicado três vezes, BRx3 = brassinolideo BR 16 aplicado três vezes. O intervalo entre as aspersões foi de 4 dias.

Ordem	Tratamento x nº de aplicações	Inoculação com SBMV
1	ASx3	Sim
2	Água	Sim
3	Água	Não
4	BRx3	Sim

As folhas destinadas para as análises das infecções sistêmicas foram trifoliolos, numerados a partir do sítio de infecção, que foram as folhas primárias. Trifoliolos o mais jovem possível e que apresentassem os sintomas de mosaico, característicos nas infecções sistêmicas de SBMV em feijoeiro Jalo, foram os critérios adotados para a coleta das amostras. Desta forma, a 5ª folha trifoliolada de todas as plantas foi coletada, 28 dias após a inoculação do SBMV. As amostras foram submetidas aos testes serológicos de PTA-ELISA, a fim de se determinar o efeito dos reguladores de crescimento na concentração de SBMV, em infecções sistêmicas.

3.8.2 Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral e na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV.

Outro experimento foi realizado com infecções sistêmicas de SBMV em plantas de feijoeiro Jalo e conduzido em casa de vegetação, a semeadura ocorreu em 23 de Janeiro e a coleta do material foi realizada em 25 de Fevereiro de 2005 (temperaturas diárias no anexo II). Neste ensaio as plantas foram cultivadas nas mesmas condições que o ensaio anterior (item 3.8.1.). Após a completa expansão da primeira folha trifoliolada, foram realizadas uma, duas ou três aplicações nas plantas, em intervalos de 4 dias, com soluções de AS (5 mM), BR 16 (1 mg/mL) ou borrifadas com água, como controle. As plantas foram então divididas em dois grupos, ambos iguais, contendo todos os tratamentos e 24 horas após a primeira aplicação dos reguladores, um grupo de plantas foi inoculado com o SBMV (conforme item 3.3) e outro grupo permaneceu sadio. Os tratamentos usados neste ensaio estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Composição dos tratamentos de efeito de reguladores de crescimento em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV. ASx3 = ácido salicílico aplicado três vezes, BRx3 = brassinolideo BR 16 aplicado três vezes. ASx2 = ácido salicílico aplicado duas vezes, BRx2 = brassinolideo BR 16 aplicado duas vezes. ASx1 = ácido salicílico aplicado uma vez, BRx1 = brassinolideo BR 16 aplicado uma vez. O intervalo entre as aplicações foi de 4 dias.

Ordem	Tratamento x nº de aplicações	Inoculação com SBMV
1	ASx3	Sim
2	ASx3	Não
3	ASx2	Sim
4	ASx2	Não
5	ASx1	Sim
6	ASx1	Não
7	Água	Não
8	Água	Sim
9	BRx1	Não
10	BRx1	Sim
11	BRx2	Não
12	BRx2	Sim
13	BRx3	Não
14	BRx3	Sim

O critério para a coleta das amostras foi o mesmo do item anterior (3.8.1), entretanto, neste experimento a 2ª folha trifoliolada de todas as plantas foi coletada 17 dias após a inoculação. Cada folíolo de cada folha foi destinado a um tipo de análise. Observando as folhas trifolioladas em sua superfície adaxial, os folíolos esquerdos das folhas foram destinados aos testes serológicos de PTA-ELISA, os folíolos centrais foram utilizados para os testes de atividades da guaiacol-peroxidase (g-POX), e os folíolos direitos foram utilizados para a determinação da atividade da L-fenilalanina amônio-liase (PAL).

3.9. Testes Serológicos

A técnica utilizada para determinar o efeito dos reguladores de crescimento na concentração viral em infecções sistêmicas de SBMV em feijoeiro Jalo foi o “Plate Trapped Antigen” PTA-ELISA, como descrito por Mowat & Dawson (1987), com algumas modificações. As amostras dos trifolíolos foram maceradas na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão carbonato de sódio (pH 9,6), acrescido de 1% p/v de sulfito de sódio (Na_2SO_3) como antioxidante. Os extratos foram centrifugados a 12.000 g por 15 minutos (4 °C). Em seguida o sobrenadante foi retirado e sofreu nova diluição com tampão carbonato de sódio, na proporção de 1:50. A primeira etapa deste método consistiu em incubar 100 µL do extrato de cada amostra na placa de ELISA, por 60 minutos em estufa a 25 ± 2 °C, utilizando sempre 4 pocinhos para cada amostra. Este tempo e temperatura foram iguais para todas as demais etapas realizadas. A placa foi então lavada três vezes com tampão de bloqueio, PBS (0,8% NaCl; 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2% KCl; 100 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4) acrescido de 2% p/v de leite em pó. A placa recebeu então 100 µL de anti-soro específico para o SBMV, diluído em tampão PBS (1:1000). Após a incubação do anti-soro, a placa sofreu uma lavagem

tripla com tampão PBS adicionado de 0,05% (v/v) de Tween-20. Foram então adicionados nos pocinhos 100 µL do anticorpo secundário, preparado contra a IgG de coelho (“Goat anti-rabbit immunoglobulin G” - Sigma-Aldrich), conjugado com fosfatase alcalina, diluído em tampão PBS (1:20.000). Após a incubação e a tripla lavagem (PBS + Tween-20) foi adicionado o substrato PNPP (p-nitrophenylphosphate), na concentração de 0,5 mg/mL. A leitura foi realizada após 90 minutos de incubação a 25 ± 2 °C, em leitor de ELISA (BioRad), considerando a absorbância a 405 nm.

Em cada placa de ELISA foi realizada uma curva de concentração utilizando SBMV purificado nas concentrações de 0, 10, 20, 40 e 80 ug, diluído em tampão carbonato de sódio. A seguir foi calculada uma curva de regressão para placa, a fim de se determinar as concentrações de SBMV presentes nas amostras.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência local em feijoeiro Moruna (nc)

4.1.1. Efeito de reguladores de crescimento no número de lesões necróticas

A aplicação prévia dos reguladores de crescimento ácido salicílico (AS) e do brassinolídeo (BR 16) em plantas de feijoeiro Moruna (nc), aplicados 24 horas antes da inoculação da plantas com *Southern bean mosaic virus* (SBMV), resultou em uma redução significativa no número de lesões necróticas em relação ao controle (plantas aspergidas com água) (Figura 04). Os resultados obtidos neste experimento foram observados também em outros 5 ensaios, revelando as mesmas diferenças estatísticas (dados não mostrados).

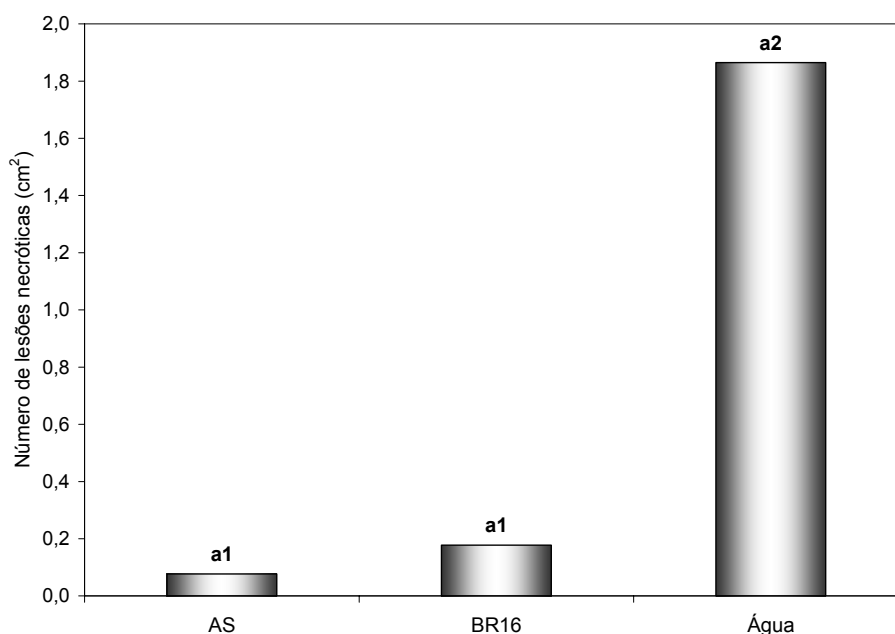


Figura 04. Efeito da aplicação prévia (24 h antes da inoculação) de reguladores de crescimento no número de lesões necróticas em plantas de feijoeiro Moruna (nc), 6 dias após a inoculação com SBMV. Letras acompanhadas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade, médias de 10 repetições (folhas).

4.1.2. Efeito de reguladores de crescimento na atividade de guaiacol-peroxidases

Plantas de feijoeiro Moruna (nc) tratadas com AS e BR 16, apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima guaiacol-peroxidase (g-POX), 24 horas após a aplicação dos reguladores de crescimento, quando comparadas com a atividade enzimática observada nas plantas aspergidas com água (Figura 5). O aumento verificado na atividade da g-POX em plantas tratadas com BR 16, foi maior do que o observado nas plantas tratadas com AS, mas esta diferença não foi significativa.

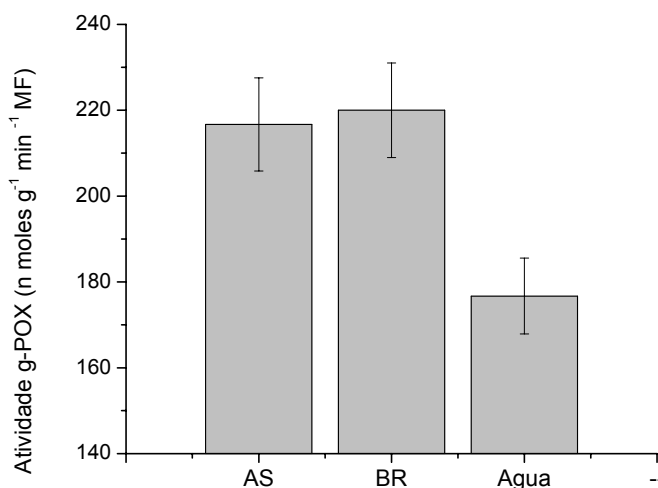


Figura 05. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase, 24 horas após a aplicação de AS e BR 16 em plantas de feijoeiro Moruna (nc), médias de 3 repetições. MF = Massa Fresca.

4.1.3. Efeito de reguladores de crescimento na evolução da atividade das guaiacol-peroxidases e no número de lesões necróticas

Dois dias após a aplicação de reguladores de crescimento, as plantas de feijoeiro Moruna (nc) tratadas com BR 16 apresentaram um aumento significativo na atividade da g-POX, em relação às plantas tratadas com AS e ao controle. Este incremento na atividade da

enzima g-POX em plantas tratadas com BR 16, permaneceu significativo até o 4º dia após a aplicação, quando ocorreu um declínio até a estabilização em um nível de atividade idêntico ao apresentado nas plantas aspergidas com água no 6º e 8º dia (Figura 6). As plantas tratadas com AS apresentaram um aumento na atividade da g-POX, dois dias após a aplicação em relação ao controle, mas esta diferença não foi significativa. Neste tratamento houve um aumento gradual entre o 4º e 6º dia na atividade da g-POX, de forma que a diferença já era significativa em relação à atividade verificada nas plantas controle no 4º dia. Entre o 6º e o 8º dia após a aplicação do AS, houve um rápido incremento na atividade da g-POX, sendo que no 8º dia esta atividade foi significativamente maior do que a observada nas plantas tratadas com BR 16 e com o controle.

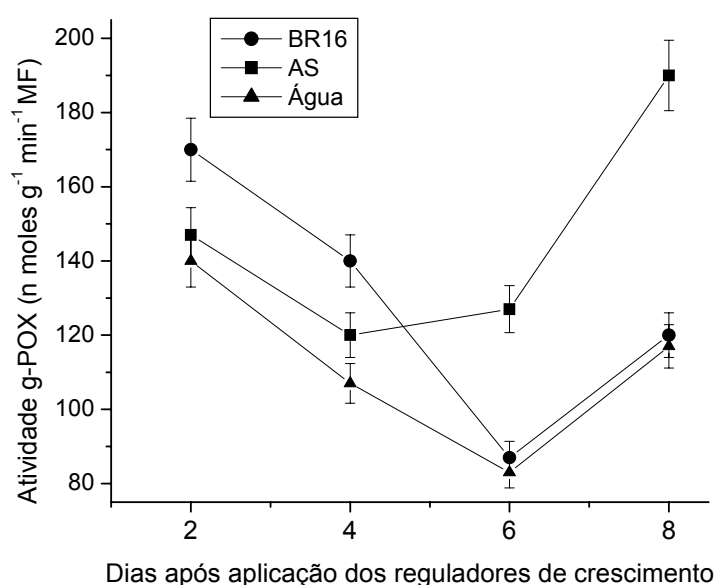


Figura 6. Efeito de AS e BR 16 na evolução da atividade de g-POX em plantas de feijoeiro Moruna (nc) (médias de 3 repetições). MF = Massa Fresca.

A inoculação de plantas de feijoeiro Moruna (nc) com o SBMV, 24 horas após a aplicação de AS e BR 16, resultou em um aumento significativo na atividade da g-POX, dois dias após a aplicação dos reguladores de crescimento em relação às plantas aspergidas com

água (controle). Nas plantas tratadas com BR 16, a atividade da g-POX declinou rapidamente até o 4º dia após a aplicação. No 6º e 8º dias, a atividade da enzima permaneceu igual aos níveis verificados nas plantas controle e foi significativamente inferior à atividade das peroxidases das plantas tratadas com AS, a partir do 4º dia (Figura 7). As plantas tratadas com AS apresentaram um aumento gradual na atividade da g-POX, em relação à atividade observada nas plantas controle no 4º e no 6º dias, e um rápido incremento entre o 6º e o 8º dia após a aplicação do regulador de crescimento. A inoculação com SBMV, 24 horas após a aplicação do AS, resultou em um aumento significativo na atividade da g-POX, em relação à atividade verificada nas plantas aspergidas com água, em todos os intervalos observados.

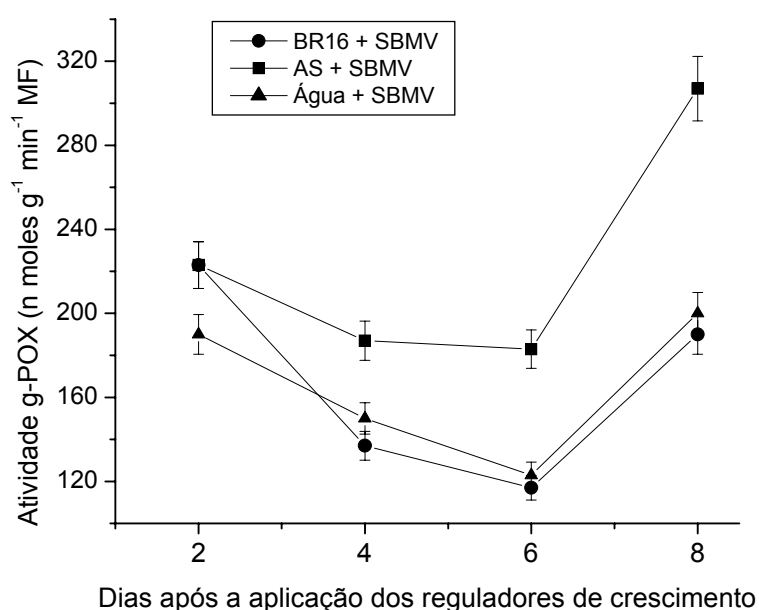


Figura 7. Efeito de AS e BR 16 na evolução da atividade da g-POX em plantas de feijoeiro Moruna (nc), inoculadas com SBMV 24 horas após a aplicação dos hormônios (médias de 3 repetições). MF = Massa Fresca.

A aplicação de AS e BR 16 em plantas de feijoeiro Moruna (nc), 24 horas antes da inoculação com o SBMV, reduziu de forma significativa o número de lesões locais em relação ao controle, uma semana após a infecção das plantas (Figura 8). Nas plantas tratadas com AS a

atividade da enzima g-POX foi significativamente maior do que a atividade verificada nas plantas tratadas com BR 16 e nas plantas controle, que por sua vez, não diferiram entre si.

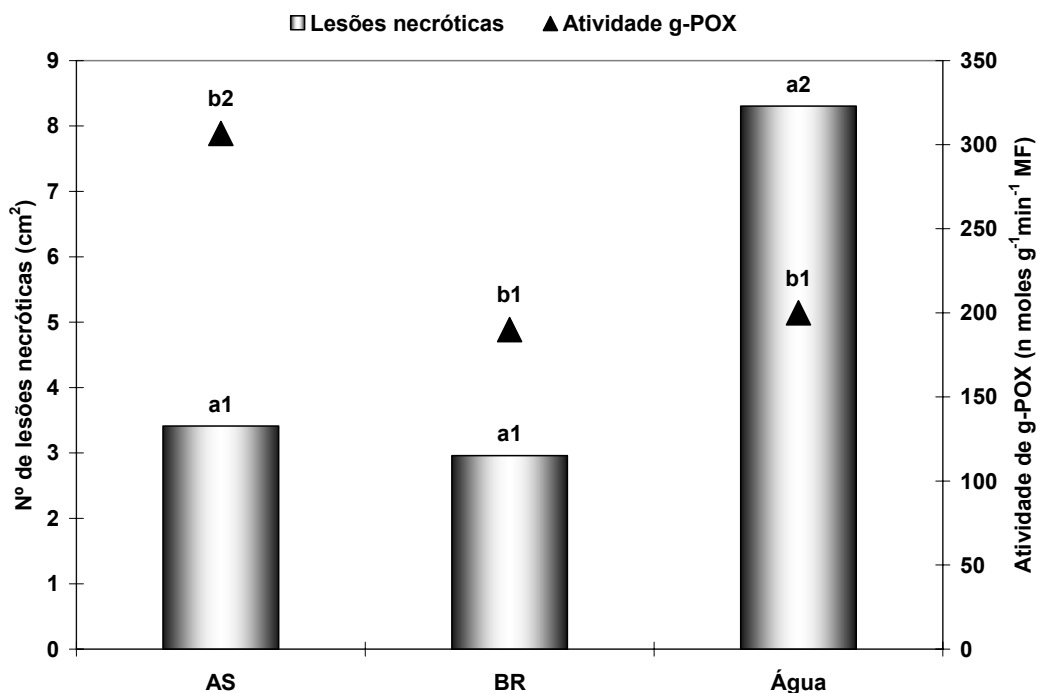


Figura 8. Efeito da aplicação de AS e BR 16 no número de lesões necróticas e na atividade de g-POX, em plantas de feijoeiro Moruna (nc), uma semana após a inoculação com SBMV. Letras acompanhadas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade (médias de 3 repetições). MF = Massa Fresca.

4.1.4. Efeito de reguladores de crescimento na atividade da L-fenilalanina amônia-liase (PAL) e no número de lesões necróticas.

Não houve efeito da aplicação de AS e BR 16, em plantas de feijoeiro Moruna (nc), na atividade da enzima L-fenilalanina amônia-liase (PAL), verificada seis dias após a aplicação dos reguladores de crescimento. No entanto, a inoculação das plantas com SBMV, 24 horas após a aplicação dos reguladores de crescimento, promoveu um aumento na atividade da PAL em todos os tratamentos, quando comparada com a atividade observada nas plantas não

inoculadas com o vírus (Figura 9). O aumento na atividade da PAL foi significativamente maior nas plantas infectadas aspergidas com água (controle), em relação ao aumento verificado nas plantas tratadas com AS e BR 16, que por sua vez, não diferiram entre si.

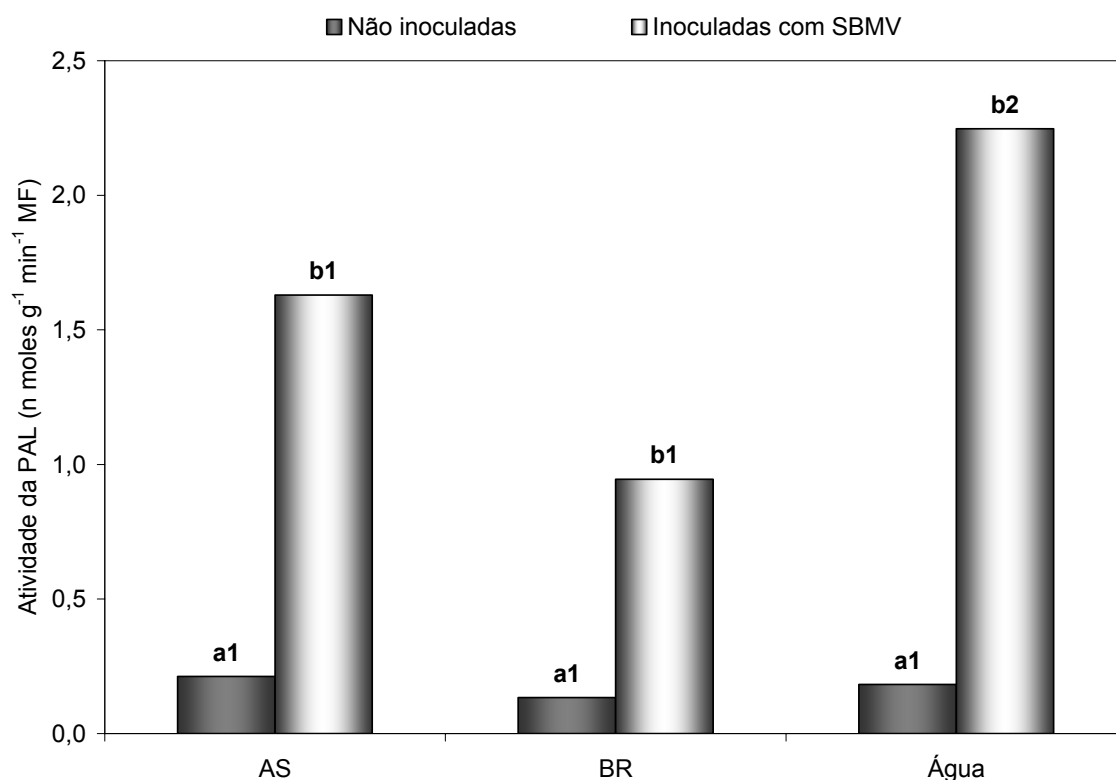


Figura 9. Efeito da aplicação de AS e BR 16 na atividade da PAL, em plantas de feijoeiro Moruna (nc), inoculadas e não inoculadas com SBMV, avaliado no 5º dia após a inoculação. Letras acompanhadas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade (médias de 3 repetições). MF = Massa Fresca.

Neste ensaio os resultados do número de lesões necróticas e da atividade da L-fenilalanina amônia-liase foram observados 5 dias após a inoculação. A aplicação prévia de AS e BR 16, 24 horas antes da inoculação com SBMV, em plantas de feijoeiro Moruna (nc), provocou uma redução significativa tanto no número de lesões necróticas quanto na atividade da PAL, em relação com as plantas aspergidas com água (Figura 10). A redução do número de lesões promovida pela aplicação de BR 16 foi significativamente maior do que a redução no número de lesões provocada pela aplicação de AS. Este fenômeno também ocorreu em relação

à atividade da PAL, onde as plantas tratadas com BR 16 apresentaram atividades mais baixas desta enzima em comparação com a atividade verificada nas plantas tratadas com AS, entretanto, a diferença neste caso não foi significativa.

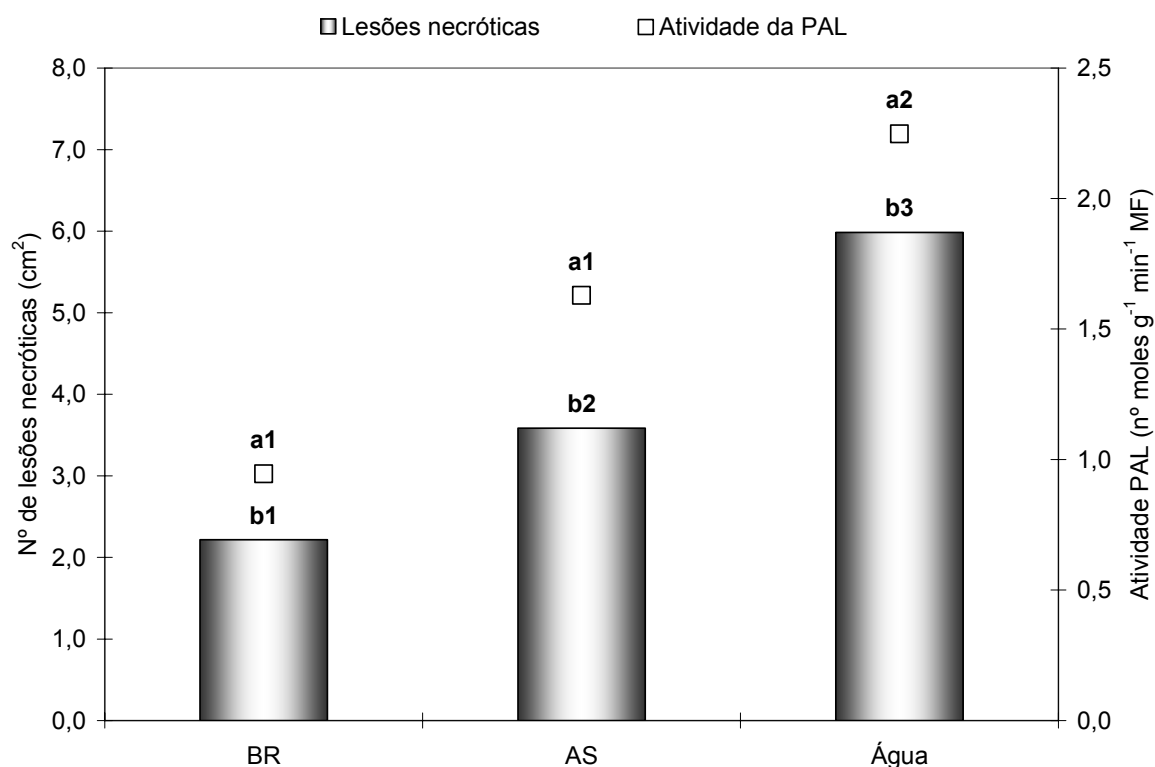


Figura 10. Efeito da aplicação de AS e BR 16 na atividade da PAL e no número de lesões locais em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV, avaliados no 5º dia após a inoculação. Letras acompanhadas dos mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade (médias de 3 repetições). MF = Massa Fresca.

4.2. Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência sistêmica

4.2.1 Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral de plantas em de feijoeiro Jalo infectadas com o SBMV

O efeito de três aplicações de AS em plantas de feijoeiro Jalo, inoculadas com SBMV, reduziu a concentração viral, na 5ª folha trifoliolada, 28 dias após a inoculação das folhas

primárias, em comparação com a concentração viral verificada nas mesmas folhas das plantas controle. Entretanto, esta redução não foi significativa. A aplicação tripla de BR 16 promoveu uma redução significativa na concentração viral no 5º trifolíolo em relação à concentração observada nos trifolíolos das plantas aspergidas com água. Quando comparadas as reduções nas concentrações de SBMV promovidas pelas aplicações de AS e BR 16, as diferenças não foram significativas (Figura 11).

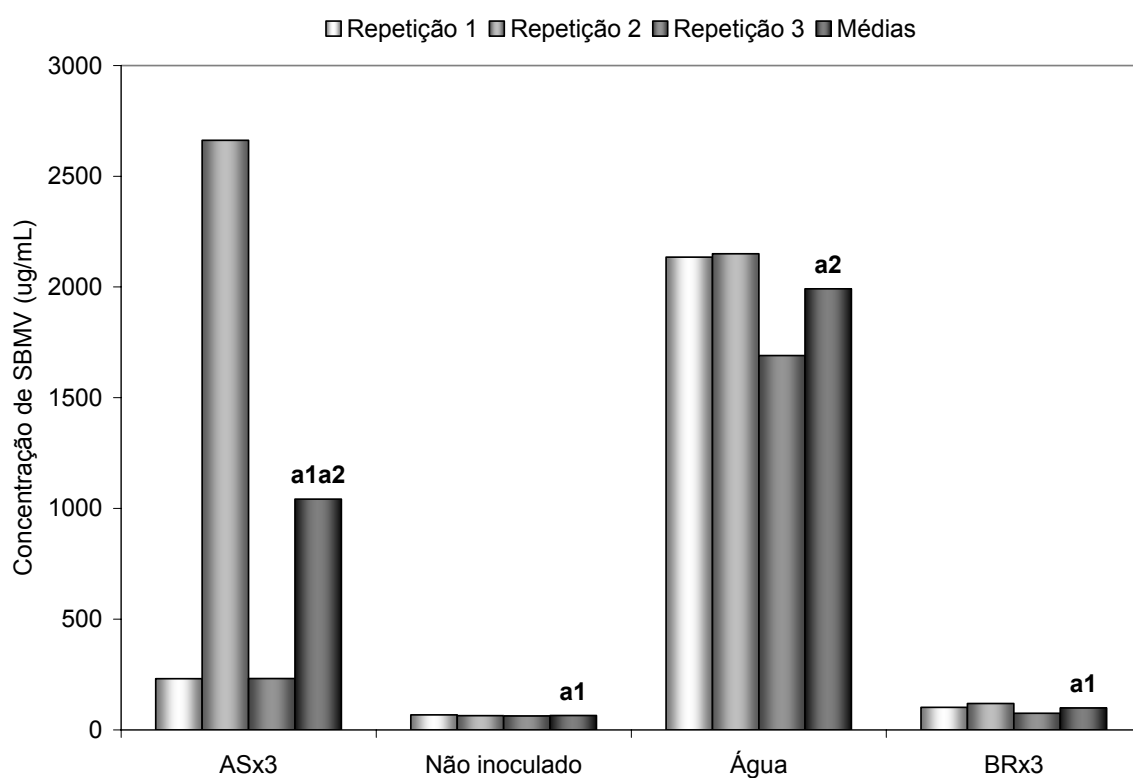


Figura 11. Efeito de três aplicações de AS e BR 16, nas concentrações de SBMV, em plantas de feijoeiro Jalo, avaliadas 28 dias após a inoculação. Letras acompanhadas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados pela raiz quadrada (SQRT) (médias de 3 repetições). ASx3 = ácido salicílico aplicado três vezes; BRx3 = brassinolídeo BR 16 aplicado três vezes.

4.2.2 Efeito de reguladores de crescimento na concentração viral e na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV.

Não houve efeito da aplicação múltipla (1, 2 ou 3 vezes) de AS e BR 16, na concentração viral da 2ª folha trifoliolada em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com SBMV, avaliadas 17 dias após a inoculação, em comparação com as concentrações virais observadas nas plantas controle (Figura 12).

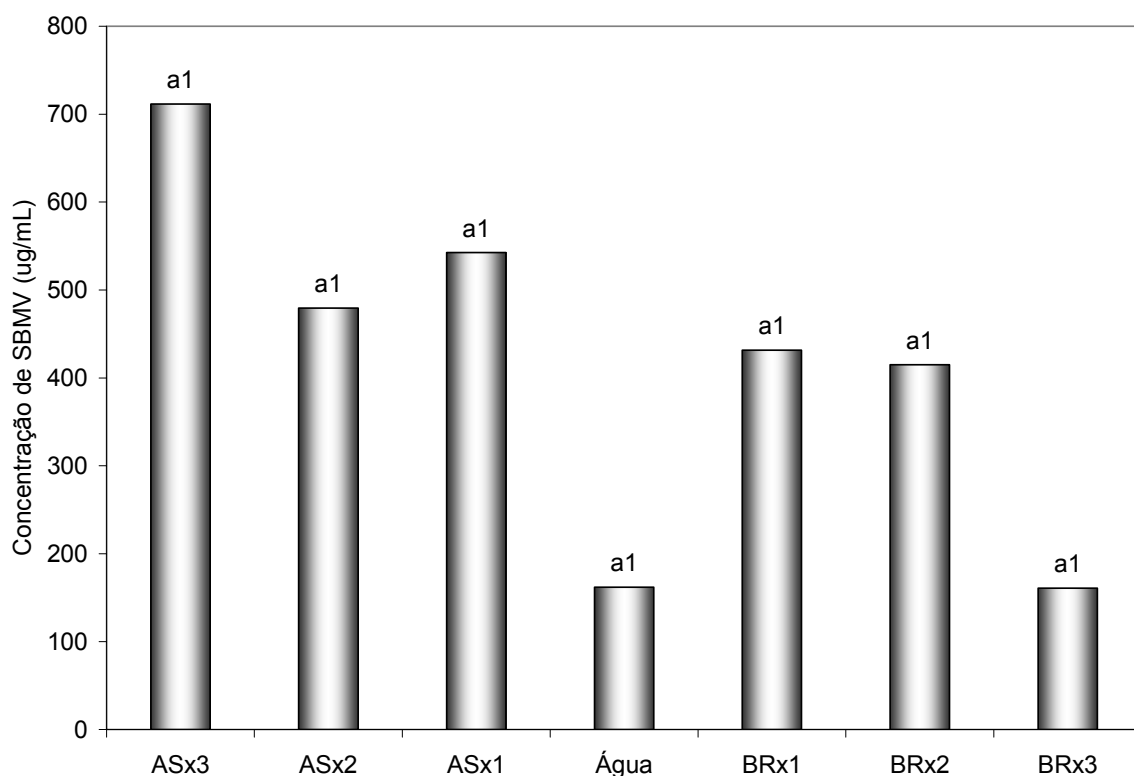


Figura 12. Efeito da aplicação múltipla de AS e BR 16, aplicados 1, 2 ou 3 vezes, nas concentrações de SBMV, em plantas de feijoeiro Jalo. As avaliações foram executadas 17 dias após a inoculação. Letras seguidas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade (médias de três repetições). ASx3 = ácido salicílico aplicado três vezes; ASx2 = ácido salicílico aplicado duas vezes; ASx1 = ácido salicílico aplicado uma vez; BRx3 = brassinolídeo BR 16 aplicado três vezes; BRx2 = brassinolídeo BR 16 aplicado duas vezes; BRx1 = brassinolídeo BR 16 aplicado uma vez.

A aplicação de AS e BR 16, em plantas de feijoeiro Jalo infectadas com o SBMV, não promoveu diferenças significativas na atividade das enzimas g-POX e PAL, na 2ª folha trifoliolada, 17 dias após a aplicação dos reguladores de crescimento, independentemente do número de aplicações realizadas (Figura 13). As plantas saudáveis que receberam os mesmos tratamentos também não apresentaram diferenças significativas na atividade destas enzimas (dados não apresentados).

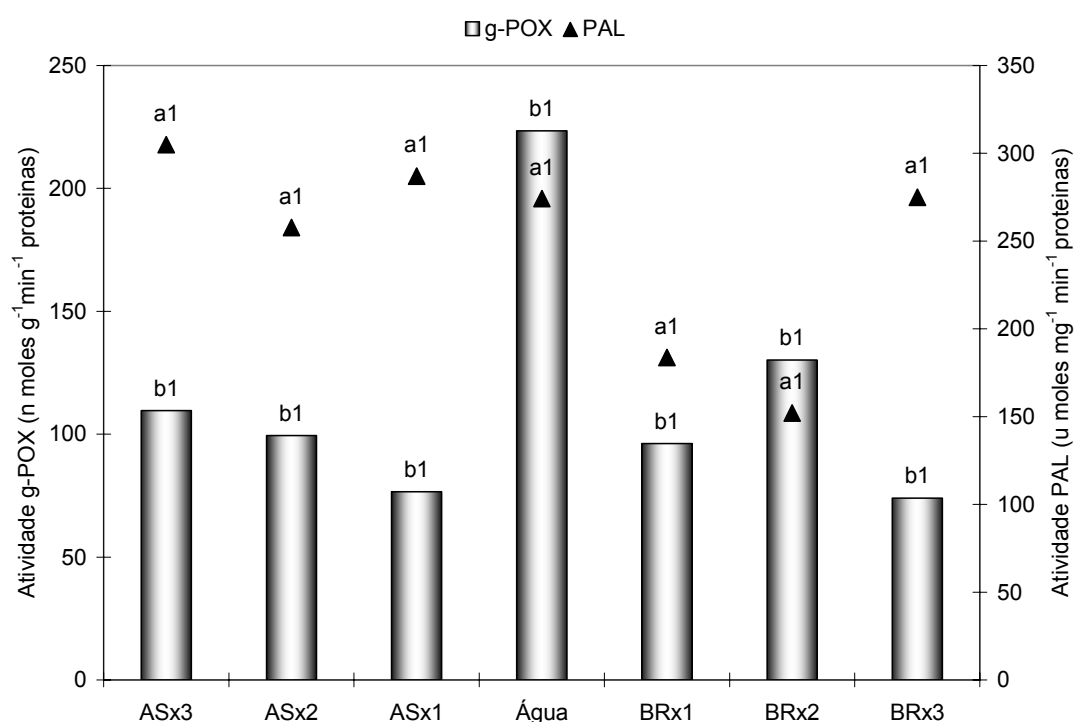


Figura 13. Efeito de reguladores de crescimento (AS e BR 16), aplicados 1, 2 ou 3 vezes, na atividade das enzimas g-POX e PAL, em plantas de feijoeiro Jalo inoculadas com SBMV. Letras acompanhadas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (médias de três repetições). ASx3 = ácido salicílico aplicado três vezes; ASx2 = ácido salicílico aplicado duas vezes; ASx1 = ácido salicílico aplicado uma vez; BRx3 = brassinolídeo BR 16 aplicado três vezes; BRx2 = brassinolídeo BR 16 aplicado duas vezes; BRx1 = brassinolídeo BR 16 aplicado uma vez.

Em relação aos resultados da atividade da enzima L-fenilalanina amônia-liase (PAL), apesar de não terem ocorrido diferenças significativas, foi observado que ao se considerar as médias das repetições, as plantas tratadas com água e infectadas apresentaram uma atividade

maior desta enzima do que as plantas tratadas com água e sadias. O mesmo resultado ocorreu nas plantas tratadas com AS, independentemente do número de aplicações, onde a atividade da PAL das plantas infectadas também foi maior do que os das plantas sadias. Esta maior atividade da PAL em plantas inoculadas parece decorrer naturalmente em função do processo infeccioso, entretanto, nas plantas tratadas com o BR 16, independentemente do número de aplicações, a atividade desta enzima foi menor nas plantas infectadas do que a verificada nas plantas sadias (Figura 14).

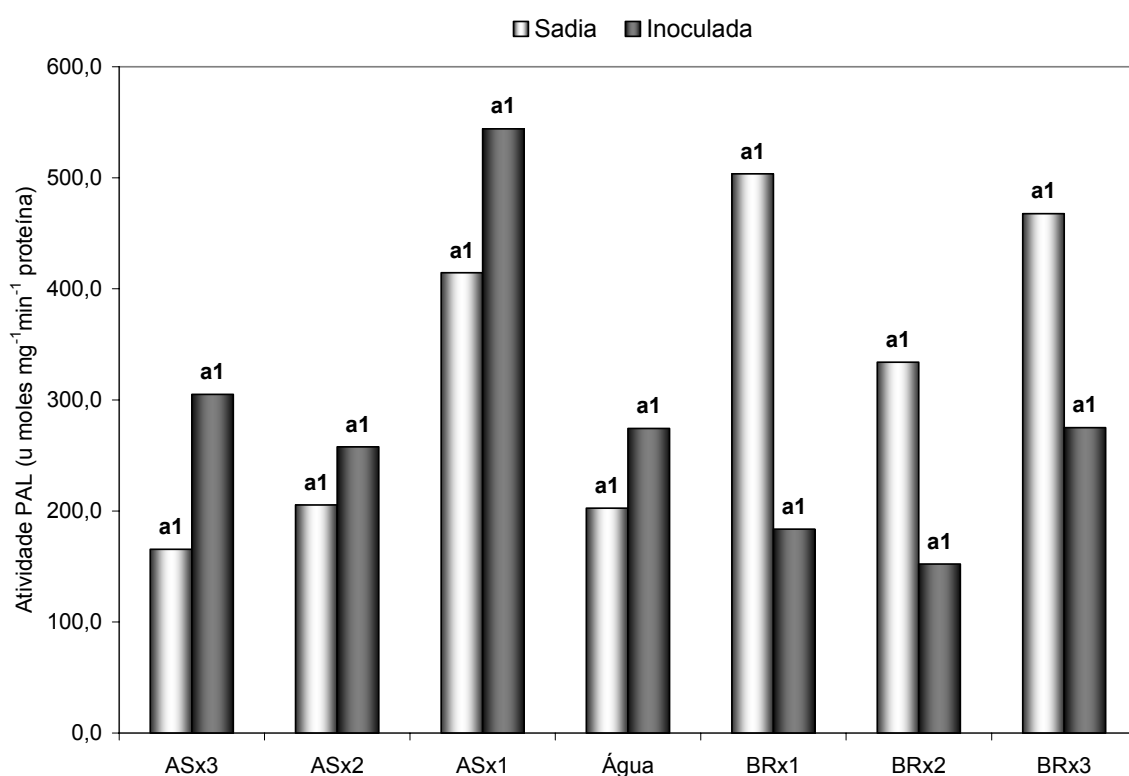


Figura 14. Efeito de reguladores de crescimento (AS e BR 16), aplicados 1, 2 ou 3 vezes, na atividade da PAL, em plantas de feijoeiro Jalo inoculadas com SBMV e sadias. Letras acompanhadas de mesmos números não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade (médias de três repetições). ASx3 = ácido salicílico aplicado três vezes; ASx2 = ácido salicílico aplicado duas vezes; ASx1 = ácido salicílico aplicado uma vez; BRx3 = brassinolídeo BR 16 aplicado três vezes; BRx2 = brassinolídeo BR 16 aplicado duas vezes; BRx1 = brassinolídeo BR 16 aplicado uma vez.

5. DISCUSSÃO

Vários testes preliminares foram conduzidos sobre o efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência em plantas e durante a execução destes ensaios, compostos reconhecidamente envolvidos nos processos de defesa foram utilizados como referência. A indução de resistência a doenças pode ser obtida através da aspersão das plantas com ácido salicílico (AS), um análogo mais potente como o ácido isinicotínico (INA) ou um composto sintético, o benzothiadiazole (BTH) (Keller *et al.*, 1996; Hammersmidt, 1999).

Ao longo das pesquisas foi realizado um escrutínio de compostos e reguladores de crescimento com potencial para indução de resistência em plantas, para verificação de algum possível efeito na indução de resistência, através da comparação dos seus efeitos com aqueles promovidos pelo AS e BTH, utilizados como padrões. Posteriormente, alguns reguladores foram descartados da pesquisa, tais como citocininas e ácido jasmônico (dados não apresentados), em função de não ter sido observado algum efeito. Entretanto, foi observado que os efeitos da aplicação do brassinolídeo BR 16, na indução de resistência local, em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com *Southern bean mosaic virus*, foram similares aos verificados nas plantas tratadas com AS e BTH. A partir deste momento, o benzothiadiazole foi descartado, permanecendo apenas o AS como parâmetro. Além de ser um hormônio de ocorrência natural nas plantas, o AS é agora reconhecido como um sinalizador com função crítica para a expressão de resistência induzida para muitos patógenos (Bostok, 1999).

5.1. Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência em plantas de feijoeiro Moruna (nc).

As infecções virais localizadas são modelos muito utilizados nas pesquisas sobre HR e SAR, uma vez que a HR é a forma mais comum de indução da SAR contra infecções virais (Pennazio & Roggero, 1998). No modelo estudado com plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV, o número de lesões locais foi avaliado 6 dias após a inoculação. Neste ensaio, a redução do número de lesões necróticas como efeito do tratamento com AS, aplicado 24 horas antes da inoculação, é consistente com a indução de resistência contra vários outros patógenos necróticos (vírus, bactérias e fungos), em uma variedade de plantas (Weete, 1992). Entretanto, o efeito da redução no número de lesões necróticas nas plantas aspergidas com BR 16, na mesma magnitude da redução observada nas plantas tratadas com AS, não era esperado (Figura 4).

A resposta de hipersensibilidade é o principal estímulo para a geração de AS, embora este regulador de crescimento pareça não ser um estímulo crítico para a morte celular (Keller *et al.*, 1996). Em infecções virais em plantas de fumo, parece haver uma relação entre quantidade de AS e o número de lesões necróticas desenvolvidas (Yalpani *et al.*, 1993). Desta forma, é possível que um aporte exógeno de AS, antes da infecção viral, promova como resultado uma redução na quantidade das lesões locais nas plantas tratadas. Entretanto, se aparentemente o AS não se relaciona com o processo de morte celular, torna-se necessário o entendimento do mecanismo pelo qual este regulador poderia restringir o número de lesões necróticas. Uma possibilidade seria pela própria forma que o processo de resposta de hipersensibilidade se desenvolve.

A rápida sinalização entre planta e patógeno resulta em um surto oxidativo (oxidative burst), que causa alterações na permeabilidade da membrana e provavelmente na estimulação

da expressão de genes (Yang *et al.*, 1997). O colapso celular ocorre algumas horas antes da necrose, como consequência da perda do controle osmótico, a destruição das membranas das organelas, e da ruptura da membrana celular das células hipersensíveis invadidas (Kato & Misawa, 1976; Goodman & Novacky, 1994). O surto oxidativo e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram explicados através de um modelo envolvendo um sistema ativado pela HR, produzindo peróxido de hidrogênio (Levine *et al.*, 1994). Alvarez *et al.* (1998) demonstraram que o surto oxidativo, promovido pela inoculação de um patógeno avirulento em *Arabidopsis*, não ocorre somente no sítio de infecção, mas também em discretas reações oxidativas em tecidos vizinhos, de células não infectadas. Desta forma, um aumento na atividade de enzimas de detoxificação das ROS, promovido pela aplicação de ácido salicílico, poderia restringir rapidamente o tamanho das lesões locais por parte das células saudáveis próximas ao sítio de infecção, de forma que muitos pontos infectados não se tornariam perceptíveis. De fato, no experimento em que plantas saudáveis foram aspergidas com AS e BR 16, houve um incremento significativo na atividade das enzimas guaiacol-peroxidases, que detoxificam moléculas de H₂O₂, 24 horas após a aplicação dos reguladores de crescimento (Figura 5).

A possibilidade de que um aumento na atividade de enzimas de proteção contra as ROS auxilie na redução do número de lesões, contrasta com alguns resultados encontrados na literatura. O aumento na quantidade de ROS, que sempre ocorre após a infecção por patógenos (Low & Merida, 1996), pode ser uma consequência direta da queda na atividade de enzimas envolvidas na detoxificação das ROS (Baker & Orlandi, 1995). Tratamentos prolongados com AS em *Arabidopsis thaliana* inativaram a catalase (CAT) e a ascorbato-peroxidase (APOX) (Rao *et al.*, 1997). Houve um declínio da atividade da CAT em folhas de fumo tratadas com AS (0,5 mM ou 1 mM) (Chen *et al.*, 1993; Conrath *et al.*, 1995). A atividade das peroxidases (POX) foi reduzida pela aplicação de 1 mM AS (Durner & Klessig, 1995). Por outro lado,

Clarke *et al.* (2002), verificaram que plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas de forma contínua com AS, e inoculadas com o *White Clover Mosaic potexvirus* (WCIMV), apresentaram um aumento na atividade das enzimas CAT, GR, SOD e POX. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), aumentou com a aplicação de 1mM de AS tanto em plantas de trigo quanto em plantas de soja (Zhao *et al.*, 1995).

Variações tão diferentes na atividade destas enzimas podem estar relacionadas com a dose, forma de aplicação ou com o momento em que as atividades foram mensuradas, entre outros fatores como a espécie, por exemplo. Estes últimos resultados e especialmente o trabalho recente de Clarke *et al.* (2002), que trabalharam com plantas de feijoeiro inoculadas com o WCIMV, sugerem que além do aumento na atividade das g-POX, promovido pela aplicação de AS, outras enzimas de detoxificação podem ter tido a sua atividade aumentada, auxiliando a redução do número de lesões locais em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com o SBMV. Por extensão, esta mesma possibilidade poderia ser imputada ao efeito da aplicação do BR 16, na redução do número de lesões locais, uma vez que 24 horas após a aplicação deste regulador também houve um aumento na atividade das g-POX, igual ao observado nas plantas tratadas com AS e significativamente maior do que verificado em relação às plantas aspergidas com água (Figura 5).

Para avaliar uma possível relação entre redução do número de lesões necróticas e o aumento na atividade das g-POX, em plantas de feijoeiro Moruna (nc) tratadas com AS e BR 16, foi executado outro experimento. Neste ensaio, a atividade da enzima g-POX e o número de lesões necóticas foram determinados sete dias após a inoculação com SBMV. As plantas tratadas com AS apresentaram resultados significativos tanto na redução no número de necróticas quanto no aumento da atividade da enzima g-POX, enquanto que nas plantas aspergidas com água (controle) os resultados foram exatamente inversos, o que sugere o efeito das enzimas de detoxificação na restrição das lesões locais. Porém, as plantas tratadas com BR

16 apresentaram uma redução significativa no número de lesões, mas sem aumento na atividade das g-POX (Figura 8).

Estes resultados abrem a possibilidade de que a redução do número de lesões necróticas, nas plantas tratadas com o BR 16, ocorreu por um mecanismo diferente, que não o da proteção antecipada contra as ROS, promovida pelo aumento da atividade das g-POX, nas células sadias circunvizinhas ao sítio de infecção. Entretanto, ao se observar os resultados do efeito da aplicação de AS e do BR 16 na evolução a atividade das g-POX, nas plantas inoculadas deste mesmo experimento, verifica-se que houve um aumento significativo na atividade das g-POX, dois dias após a aplicação dos reguladores de crescimento (24 horas após a inoculação) com ambos os reguladores de crescimento. Nas plantas tratadas com BR 16, este aumento na atividade das peroxidases, declinou rapidamente quatro dias após a aplicação do BR 16 (3 dias após a inoculação). No caso das plantas tratadas com AS, este aumento foi sustentado e ampliado, ao longo de todas as demais verificações (Figura 7).

Segundo Lagrimi & Rothstein (1987), as inoculações sempre resultam em danos aos tecidos e, os aumentos iniciais na atividade das enzimas de detoxificação estariam mais envolvidos com a resposta a estes ferimentos. Entretanto, esta possibilidade não se aplica nos resultados obtidos neste experimento, em relação ao aumento da atividade da g-POX promovido pelo AS, em função da continuidade do incremento ao longo da evolução da atividade da enzima (Figura 7). Em relação ao aumento na atividade das g-POX, dois dias após a aplicação do BR 16, e o rápido declínio subsequente, é pouco provável que este incremento observado tenha ocorrido apenas como uma resposta aos ferimentos decorrentes da inoculação com o SBMV. Como já observado anteriormente, a aspersão de BR 16 em plantas sadias promove um aumento na atividade das g-POX, 24 horas após a aplicação do regulador de crescimento. Além disso, ao se observar a evolução da atividade das g-POX, em plantas sadias tratadas com AS e BR 16, apenas as plantas que receberam o brassinolídeo

apresentaram aumento significativo na atividade das g-POX, uma vez que o incremento verificado nas plantas tratadas com AS não foi significativo, dois dias após a aplicação dos reguladores (Figura 6). Além disso, o aumento na atividade das g-POX em plantas sadias tratadas com BR 16 permaneceu significativo até o quarto dia após a aplicação, mais tempo do que o observado nas plantas tratadas com este regulador e inoculadas. Portanto, no caso específico do BR 16, a inoculação não aparenta ser a responsável pelo aumento inicial na atividade das g-POX, ao contrário, parece reduzir o tempo em que a atividade destas enzimas permanece superior à atividade observada nas plantas controle.

Apesar da inoculação em si e a infecção com SBMV promoverem uma maior atividade das g-POX, foi verificado um aumento inicial na atividade destas enzimas em plantas tratadas com AS e BR 16. Entretanto, se este aumento inicial na atividade das g-POX das plantas tratadas com BR 16 seria suficiente para uma restrição do número de lesões necróticas, como as observadas neste experimento, é outra questão que se coloca. É possível que o efeito na redução do número de lesões locais, em plantas de feijoeiro Moruna (nc) tratadas com BR 16, tenha ocorrido por um mecanismo completamente diferente.

No processo de desenvolvimento do surto oxidativo, além do modelo gerador de ROS do sistema NADPH oxidase, existe a proposta de um segundo modelo, o sistema dependente de peroxidases, similar ao primeiro, no entanto, as proteínas peroxidases responsáveis pela produção de ROS estariam no apoplasto. Nesse modelo, a alcalinização do apoplasto é obrigatória, além da presença de agentes redutores nesta região (Falk *et al.*, 1999). Da mesma forma que no modelo NADPH oxidase, a interação receptor-ligante está acoplada com a abertura de canais de íons devido à interação direta com uma proteína G ou por meio da ação da adenilato ciclase. O influxo de Ca^{+2} ativaria diretamente, ou por meio de cinases dependente de Ca^{+2} (CDPK), uma NADPH oxidase. Uma vez ativada, esta proteína seria capaz de promover a redução de uma molécula de oxigênio gerando radicais superóxidos (O_2^-)

que seriam rapidamente convertidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pela ação da proteína superóxido dismutase (SOD) (Bolwell, 1999). Os radicais superóxido de oxigênio podem gerar radicais de hidroperoxil ($\text{HO}_2^\cdot$) que são capazes de atravessar membranas tão eficientemente quanto os radicais de peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio (e possivelmente metabólitos relacionados) funciona como um gatilho local para a morte celular programada de células desafiadas e como um sinal difusível para a indução de genes de proteção celular, nas células circunvizinhas (Levine *et al.*, 1994). Em condições apropriadas, o hidroperoxil e o peróxido de hidrogênio podem converter os ácidos linoléico, linolênico e araquidônico em peróxidos lipídicos, que atuam como moléculas sinalizadoras. Além disso, o peróxido de hidrogênio pode atuar como substrato para peroxidação lipídica, envolvendo lipoxygenases, levando à formação de precursores do ácido jasmônico, que também têm função sinalizadora. O peróxido de hidrogênio promove ainda a atividade da 2-ácido benzóico hidroxilase (BA2-H), enzima que é requerida para a síntese de ácido salicílico (SA) e ainda, Lamb & Dixon (1997) relataram a expressão de genes que codificam L-fenilalanina amônia-liase (PAL), induzidos pelo H_2O_2 .

O desbalanço do potencial redox causado por ROS pode ainda alterar o padrão de expressão gênica. A estabilidade de alguns transcritos envolvidos na repostas de defesa também pode ser regulada pelo balanço redox. Concomitantemente à geração de ROS, ocorre a síntese *de novo* de óxido nítrico (NO), detectada no sítio de infecção. Durner *et al.* (1998) demonstraram que a atividade da proteína óxido nítrico sintase (NOS) aumentou quatro a cinco vezes em folhas de tabaco após a infecção com o vírus do mosaico do tabaco. O óxido nítrico (NO) potencializa a indução de morte celular no sítio da infecção, provavelmente pela sua capacidade de inibir as enzimas catalase e peroxidase, as quais detoxificam os radicais H_2O_2 . O óxido nítrico também é capaz de ativar a proteína adenilato ciclase que, via AMP cíclico, induz à expressão de PAL. A fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima na rota dos

fenilpropanóides, que estão envolvidos na síntese de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, conhecidos como fitoalexinas (Klessig, 2000).

A redução do número de lesões locais, promovida pela aplicação de BR 16, em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com o SBMV, poderia ser devida a uma maior expressão dos genes que codificam a PAL, promovida pela indução através do peróxido de hidrogênio e sinalizadores relacionados ou derivados. O efeito da aplicação de AS e BR 16 na atividade da L fenilalanina amônia-liase, em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV e não inoculadas, foi verificado 6 dias após a aplicação dos reguladores de crescimento nas plantas (5 dias após a inoculação no caso das plantas infectadas). Nenhum efeito na atividade da PAL foi verificado pela aplicação dos reguladores de crescimento. Entretanto, a inoculação com SBMV promoveu um aumento significativo na atividade desta enzima (Figura 9). Ao analisar a relação entre a atividade da PAL e o número de lesões necróticas, foi observada uma proporcionalidade, onde a redução do número de lesões foi acompanhada por uma redução semelhante na atividade desta enzima (Figura 10). Desta forma, neste experimento, nenhuma relação foi encontrada entre a atividade da PAL e a redução do número de lesões locais tanto nas plantas tratadas com AS quanto naquelas que receberam BR 16. A impossibilidade de relacionar a redução do número de lesões com aumento de atividade da g-POX ou da PAL, e plantas tratadas com BR 16, sugere que outras rotas devem ser consideradas.

A ativação de genes de defesa por ROS, NO e ácido salicílico ocorre sinergicamente não só no sítio da infecção, mas por toda a planta, levando à SAR (Dangl *et al.*, 1996; Ousbourn, 1996), que requer ácido salicílico (Dempsey, 1999). Durante esta resposta ocorre a expressão de diversas proteínas relacionadas à patogênese (PR), algumas das quais apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* e intensificam a resposta de resistência quando superexpressadas. O gene *NPR1*, clonado em *Arabidopsis* é requerido tanto para o estabelecimento de SAR como para expressão de PR-1, induzidas por SA (Cao *et al.*, 1994).

Uma diferente resposta sistêmica foi descoberta recentemente em plantas que respondem a cepas não-patogênicas da bactéria colonizadora de raízes *Pseudomonas fluorescens*. Esta resposta tem sido referida como Resistência Sistêmica Induzida (ISR) e também é efetiva para múltiplos patógenos (McDowell & Dangl, 2000; Pieterse, 1998). ISR é independente de SA e não está associada com a ativação da expressão de PR-1, porém requer a operação das rotas sinalizadoras que respondem ao ácido jasmônico (JA) e ao etileno. Embora independente de SA, ISR requer a expressão do gene *NPR1*, sugerindo que este gene tem um papel basal nas respostas sistêmicas de defesa das plantas. *NPR1* apresenta um sinal de localização nuclear (NLS) e parece ser capaz de interagir com elementos responsivos a SA nas regiões promotoras dos genes relacionados com a patogênese.

Etileno e JA são moléculas sinalizadoras envolvidas na resposta de defesa a estresses bióticos e abióticos. Induzem a expressão de compostos antimicrobianos não induzidos por SA. Acredita-se que estas moléculas atuem em uma cascata antagonista à cascata envolvendo SA, embora possa haver cruzamento entre estas duas rotas de sinalização (Dong, 1998). O papel destas duas moléculas nas repostas de defesa a patógenos em plantas ainda não está muito bem esclarecido.

Um supressor de *NPR1*, denominado *SSI*, foi identificado mais recentemente, e demonstrou-se que nos duplos-mutantes (*npr1-ssi*) há expressão constitutiva de *PDF1.2*, um gene marcador para a rota dependente de JA, de maneira dependente de SA, o que leva a uma nova interpretação destas rotas de sinalização, ou seja, que os processos dependentes de SA podem ser desacoplados do gene *NPR1* e que haja interação entre as duas rotas (Shah *et al.*, 1999; Feys, 2000). Também, de maneira intrigante, o gene marcador *PDF1.2* da rota de JA não é expresso durante a ISR, indicando um desvio na rota para expressão dessa defensina.

Da mesma forma que o etileno e o ácido jasmônico, é possível que ocorra algum cruzamento na rota de sinalização de defesa promovida pela aplicação do brassinolídeo BR 16

com a do AS, ou ainda, que este deflagre diretamente a expressão de genes de defesa. Os resultados encontrados na redução do número de lesões necróticas em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com SBMV, através da aplicação prévia de AS e BR 16, são consistentes tanto pelas diferenças significativas encontradas em todos os ensaios quanto pela alta repetibilidade dos resultados.

5.2. Efeito de reguladores de crescimento na indução de resistência em plantas de feijoeiro Jalo.

Plantas de feijoeiro Jalo submetidas a uma aplicação prévia de BR 16, 24 horas antes da inoculação com SBMV, e mais duas aspersões posteriores no quarto e no oitavo dia após a primeira aplicação com este regulador de crescimento, apresentaram uma redução significativa na concentração viral, na 5ª folha trifoliolada, 28 dias após a inoculação das folhas primárias, em relação às plantas aspergidas com água. A aplicação tríplex de AS também promoveu um efeito significativo na redução da concentração de SBMV, entretanto, devido ao resultado de uma das repetições neste tratamento, houve a necessidade da transformação estatística dos resultados neste experimento (Figura 11). Ao se comparar a concentração viral das plantas controle negativo (sadias) com a verificada nas plantas tratadas com BR 16, os resultados são idênticos (Figura 11). Isto se deve provavelmente à menor sensibilidade do teste serológico PTA-ELISA, em comparação com a sensibilidade do DAS-ELISA, que pode desta forma, não ter detectado as baixas concentrações virais que ocorreram nas plantas tratadas com o brassinolídeo, aparentando que estas plantas não foram inoculadas.

A redução na concentração de SBMV, em infecções sistêmicas de feijoeiro Jalo, como efeito da tríplex aplicação de BR 16, foi significativa e parece ser consistente com a redução do número de lesões necróticas observada nas plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas

com o SBMV. Estes resultados sugerem a ocorrência de uma indução de resistência tanto local quanto sistêmica, promovida pelo brassinolídeo BR 16. Foi também observado que os sintomas de mosaico, característico das infecções sistêmicas de SBMV em feijoeiro Jalo, foram menos intensos nas folhas das plantas tratadas com o BR 16, do que os expressados nas plantas do controle positivo (plantas inoculadas) e também em relação às plantas tratadas com AS. Um fenômeno interessante ocorreu em um ensaio com plantas de feijoeiro Jalo, tratadas com uma, duas ou três aplicações de AS e BR 16, e inoculadas com o SBMV, que foi cancelado em função da ocorrência de oídio (*Erysiphe polygoni*). Antes do descarte das plantas, foi observado que os sintomas menos severos ocorreram nas plantas tratadas três vezes com o BR 16 em comparação com todos os demais tratamentos. A doença ocorreu de forma espontânea e não controlada, de forma que as lesões (manchas) não foram mensuradas. De todo modo, apesar da nulidade empírica, este incidente sugere um efeito de indução de resistência de amplo espectro, como caracterizado na SAR, pela aplicação do BR 16.

Para se testar o efeito de uma, duas ou três aplicações de AS e BR 16, na concentração viral em infecções sistêmicas, outro experimento com feijoeiro Jalo foi executado. A primeira aplicação dos reguladores de crescimento foi executada 24 horas antes da inoculação com o SBMV, e as demais ocorreram no quarto e no oitavo dia após a primeira aplicação. Neste experimento a segunda folha trifoliolada foi coletada de todos dos tratamentos, 17 dias após a inoculação, quando também foi verificado o efeito da aplicação dos reguladores de crescimento na atividade das enzimas g-POX e da PAL. Não houve efeito da aplicação dos reguladores de crescimento na concentração viral (Figura 12). Da mesma forma, não houve diferença na atividade das enzimas g-POX e PAL, nas plantas de feijoeiro Jalo tratadas com AS e BR 16, no intervalo de tempo analisado, tanto nas plantas inoculadas (Figura 13), quanto nas sadias (resultados não apresentados). Entretanto, apesar de não ter ocorrido diferenças significativas, ao se comparar as médias da atividade da PAL entre as plantas inoculadas e as

sadias, tratadas com BR 16, as médias das plantas infectadas, se revelaram menores do que as médias das plantas sadias (Figura 14). O efeito da inoculação com o SBMV, nas plantas tratadas com BR 16, deveria ter promovido um aumento na atividade desta enzima, exatamente como o verificado nas plantas inoculadas e tratadas com AS. Portanto, estas atividades médias menores da PAL, em plantas tratadas com SBMV e tratadas com BR 16, reforçam os resultados verificados nos experimentos com a atividade da PAL, em feijoeiro Moruna (nc), em que a aplicação do BR 16 em plantas infectadas promove uma redução na atividade desta enzima.

Este experimento expôs as limitações do método utilizado nas pesquisas de indução de resistência, utilizando o modelo de infecções sistêmicas em feijoeiro Jalo. Neste sistema, as aplicações são exógenas, realizadas através da aspersão manual dos reguladores de crescimento. Este sistema revelou-se adequado para os ensaios de indução de resistência local, com plantas de feijoeiro Moruna (nc), provavelmente em função da natureza dinâmica do processo de resposta de hipersensibilidade. Nesta resposta, as reações ocorrem em poucos dias, sob a influência dos reguladores de crescimento, aplicados 24 horas antes das inoculações com o SBMV. Para o modelo de infecções sistêmicas, onde um tempo mínimo é necessário para a dispersão do vírus, ocorre um distanciamento entre a aplicação inicial do regulador de crescimento e o momento da coleta do trifoliolo. Reaplicações hormonais podem implicar em problemas de “timing”, em que sinalizações repetidas podem provocar efeitos antagônicos e não sinérgicos, na indução de resistência. Existe ainda o caráter individual de resposta de cada folha ao processo da invasão sistêmica e a própria dispersão do vírus que está condicionada à variação da temperatura.

Os dados apresentados na Figura 11, referem-se ao ensaio em plantas de feijoeiro Jalo, com três aplicações de AS e BR 16, e infectadas com SBMV, em que houve uma redução significativa na concentração viral das plantas tratadas com BR 16. Entretanto, este ensaio se

desenvolveu entre Maio e Junho de 2004, com temperaturas médias diárias de 17,8 °C (Anexo I), onde a 5ª folha foi amostrada, 28 dias após a inoculação. O segundo ensaio com plantas de feijoeiro Jalo, tratado com AS e BR 16, ocorreu entre Janeiro e Fevereiro de 2005, onde a 2ª folha trifoliolada foi coletada 17 dias após a inoculação com SBMV, e as temperaturas médias diárias foram de 23,9 °C. Neste experimento não houve efeito dos tratamentos nas concentrações virais, nem na atividade das enzimas g-POX e PAL. Isto demonstra que para ensaios com o modelo de infecções sistêmicas, o fornecimento dos reguladores deveria ser feito de forma contínua, talvez com concentrações próximas às fisiológicas, e seguramente sob condições de temperatura controlada.

A descoberta do papel dos brassinosteróides no crescimento e desenvolvimento de plantas, ocorrida nos últimos anos foi um fenômeno marcante na estudo da fisiologia vegetal. A interação entre os BRs e outros hormônios envolvidos neste processo sugere uma rede complexa de sinalização hormonal com efeitos na indução da expressão de genes. A possibilidade do papel dos BRs na adaptação aos estresses ambientais e ataque de patógenos é igualmente intrigante (Haubrick & Assmann, 2006). Os resultados obtidos na indução de resistência local com plantas de feijoeiro Moruna (nc), e na indução de resistência sistêmica com plantas de feijoeiro Jalo, inoculadas com SBMV, sugerem uma participação do BR 16, nos processos de indução de defesa tão importantes quanto àqueles promovidos pela aplicação do AS.

6. CONCLUSÕES

- 1) A aplicação exógena de ácido salicílico (AS) ou do brassinolídeo (BR 16) em plantas de feijoeiro Moruna (nc) inoculadas com o *Southern bean mosaic virus* (SBMV) promoveu uma redução significativa no número de lesões necróticas e na atividade da enzima guaiacol peroxidases (g-POX), mas não teve efeito sobre a atividade da L-fenilalanina amônia-liase (PAL).
- 2) Aplicações exógenas com BR 16 em plantas de feijoeiro Jalo inoculadas com SBMV podem ter contribuído para uma redução significativa na concentração viral na 5ª folha trifoliolada, 28 dias após a infecção das folhas primárias.
- 3) Os dados sugerem que a aplicação exógena de AS ou BR 16 promove um efeito na indução de resistência local em plantas de feijoeiro Moruna (nc), inoculadas com o SBMV.

7. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 1998. Plant Pathology. Academic Press, London.
- Alvarez, M.E., Pennel, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell, 92:773-784.
- Arias, M. C., Lenardon, S. L., Taleisnik, E. 2003. Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the *Sunflower chlorotic mottle virus*. Journal of Phytopathology, 151:267–273.
- Arteca, R.N. 1995. Brassinosteroids. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 206–213.
- Back, T.G. & Pharis, R.P. 2003. Structure-activity studies of brassinosteroids and the search for novel analogues and mimetics with improved bioactivity. Journal of Plant Growth Regulation, 22:350–361.
- Bajguz, A. & Tretyn, A. 2003. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. Phytochemistry, 62:1027-1046.
- Baker, C.J. & Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology, 33:299-321.
- Bianchini, A., Maringoni, A.C., Carneiro, S.M.T.P.G. 1997. Doenças de feijoeiro. In: Kimati, H., Amorin, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds.) Manual de Fitopatologia, 3rd ed., Agronômica Ceres, pp. 376-399.
- Bishop, G. J. & Koncz, C. 2002. Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling. The Plant Cell, 14:S97-S110.

- Bolwell, G.P. 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. Plant Biology, 2:287-294.
- Bostock, R.M. 1999. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. Plant Pathology, 55:99-109.
- Brandão, A.S.P., Rezende, G. C., Marques, R.W.C. 2005. Crescimento Agrícola no Período 1999/2004, Explosão da Área Plantada com Soja e Meio Ambiente no Brasil. Acessado em 15 de Abril de 2006, às 11:00 hs. Disponível em: <http://www.econ.puc-rio.br/PDF/seminario/2005/gervasio%20rezende.pdf>.
- Brosa, C. 1999. Structure-activity relationship. Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. Eds. A. Sakurai, T. Yokota & S.D. Clouse, pp. 191–222.
- Buchanan, B., Gruisen, W., Jones, L. R. 2000. Response to Plant Pathogens. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, pp 1133.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, S., Dong, X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell, 6:1583-1592.
- Cavalcanti, L.S. 2003. Ativadores de resistência disponíveis comercialmente. Summa Phytopathologica, Vol.29, nº 1.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. 1993. Active oxygen reactive species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science, 262:1883-1886.
- Clarke, S.F., Guy, P.L., Burritt, D.J., Jameson, P. E. 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. Physiologia Plantarum, 114:157-164.
- CONAB, 2006. Acesso em 03 de Maio de 2006. Disponível em <http://www.conab.gov.br/download/safra/BrasilProdutoSerieHist.xls>.

- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R., Klessig, D.F. 1995. Two inducers of plant defense responses, 2,6, dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 92:7143-7147.
- Costa, A.S. 1987. Fitoviroses do feijoeiro no Brasil. In: Bulisani, E.A. Feijão: fatores de produção e qualidade. Campinas: Fundação Cargill. 1987. pp.173-256.
- Costa, A.S., Kitajima, E.W., Miysaka, S., Almeida, L.D. 1972. Moléstias de feijoeiros causadas por vírus. Anais, I Simpósio Brasileiro do Feijão/ Viçosa, 1972. pp. 342-384.
- Cruickshank, I.A.M. & Mandryk, M. 1960. The effect of stem infestations of tobacco with 190 Percival: Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants *Peronospora tabacina* adam. on foliage reaction to blue mold. J. Aust. Inst. Agric. Sci., 26:369–372.
- Cupertino, F.P., Lin, M.T., Kitajima, E.W., Costa, C.L. 1982. Occurrence of *Southern bean mosaic virus* in central Brazil. Plant Disease, 66:742-743.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell, 8:1793-1807.
- Dawson, W.O. & Hilf, M.E. 1992. Host-range determinants of plant viruses. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, 43:527-555.
- Dempsey, D.A. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. Critical Review in Plant Science, 18:547-573.
- Doke, N., Chai, H.B., Kawaguchi, A. 1987. Biochemical basis of triggering and suppression of hypersensitive cell response. In: Molecular determinants of plant diseases. Eds: Nishimura, Vance & Doke. Tokyo, Springer-Verlag/ Japan. Scientific Societies Press, pp. 75-95.
- Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene, and resistance in plants. Current Opinion in Plant Biology, 1:316-323.

- Durner, J. & Klessig, D.F. 1995. Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6,-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense response. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 92:11312-11316.
- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends in Plant Science, 2:243-283.
- Durner, J., Wensehenne, D., Klessig, D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95:10328-10333.
- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., Raskin, I. 1992. Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 89: 2480-2484.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., Parker, J.E. 1999. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eucaryotic lipases. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 96:3292-3297.
- Feys, B.J. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. TIG, 16:449-455.
- Fraser, R. S. S. & Whenham, R.J. 1982. Plant growth regulators and virus infection: a critical review. Plant Growth Regulators, 1:37-59.
- Fraser, R.S.S. 1985. Mechanisms of induced resistance to virus diseases. In: Fraser R.S.S. ed. Mechanisms of induced resistance to virus diseases. pp 373-404. Nijhoff/Dr. Junk, Dordrecht, The Netherlands.
- Fujioka, S. 1999. Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom. In Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones. (eds A. Sakurai, T. Yokota & S.D. Clouse), pp. 21-46. Springer, Tokyo, Japan.

- Fujioka, S. & Yokota, T. 2003. Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. Annual Review of Plant Biology, 54:137-164.
- Gaspar, T.H., Penel, C., Hagege, D., Greppin, H. 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development process. In: Biochemical, molecular and physiological aspects of peroxidases. Eds.: Lobarzevski, Greppin, Pennel, Gaspar. University of Geneva, pp. 249-280.
- Gilpatrick, J.D. & Weintraub, M. 1952. An unusual type of protection with the *Carnation mosaic virus*. Science, 115:701-702.
- Goldberg, R., Catesson, A.M., Czaninski, Y. 1983. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. Zeitschrift Pflanzenphysiologie, 110:267-279.
- Goodman, R.N., Király, Z., Wood, K.R. 1986. The biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press, Columbia, 435p.
- Goodman, R.N. & Novacky, A.J. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A resistance phenomenon. APS. St. Paul, Minnesota.
- Guo, A., Durner, J., Klessig, D.F. 1998. Characterization of tobacco epoxide hydrolase gene induced during the resistance response to TMV. Plant Journal, 15:647–656.
- Hammerschmidt, R. & Dann, E. K. 1997. Induced resistance to disease. In: Rechcigl N. A., Rechcigl J.E., ed. Environmentally Safe Approaches to Plant Disease Control. Boca Raton, Florida, U.S.A.:CRC Lewis Publishers, 177-199.
- Hammerschmidt, R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? Physiological and Molecular Plant Pathology, 55 (2):77-84.
- Haubrick, L. L. & Assmann, S. M. 2006. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. Plant, Cell and Environment, 29:446–457.

- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plants without soil. Californian Agriculture Experimental Station Bulletin, 347:36-39.
- Hooft van Huijsduijnen, R.M., Alblas, S.W., De Rijk, R.H., Bol, F. 1986. Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to *Alfafa mosaic virus* infections in various plant species. Journal of General Virology, 67:2135-2143.
- Jameson, P.E. & Clarke, S.F. 2002. Hormone-Virus Interactions in Plants. Critical Reviews in Plant Science, 21 (3):205-228.
- Kato, S. & Misawa, T. 1976. Lipid peroxidation during the appearance of hypersensitive reaction in cowpea leaves infected with *Cucumber mosaic virus*. Annual Review of Phytopathology Society, 42:472-480.
- Keen, N.T. 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annual Review of Genetics, 24:447-463.
- Kegler, H. & Spaar, D. 1993. Types of and genes for resistance to plant pathogenic viruses. Archiv für Phytopathologie and Pflanzenschutz, 28:95-107.
- Keller H., Bonnet, P., Galiana, E., Pruvot, L., Friedrich, L., Ryals, J., Ricci, P. 1996. Salicylic acid mediates elicitor-induced systemic acquired resistance, but not necrosis in tobacco. Molecular Plant Microbe Interactions, 9:696-703.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., Groot, A.D. 2000. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for XXI century. Annual of Botany, 86:441-447.
- Király, Z. 1980. Defenses triggered by the invader: hypersensitivity. In: How plants defend themselves: an advanced treatise. Eds: Horsfall, & Cowling. New York, Academic Press, 5:201-224.
- Klessig, D.F. & Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. Plant Molecular Biology, 26:1439-1458.

- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. PNAS, 97 (16):8849-8855.
- Kuc, J. & Strobel, M. E. 1992. Induced resistance using pathogens and non pathogens. In: Hammersmidt, R. & Kuc, J. eds. Biological control of plant disease, progress and challenges for the future, pp. 295-303. Plenum Press, New York.
- Lagrimini, L.M. & Rothstein, S. 1987. Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and *Tobacco mosaic virus* infection. Plant Physiology, 84:438-442.
- Lamb, C.J. & Dixon, R.A. 1997. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:251-275.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8:863-870.
- Lee, H. & Raskin, I. 1998. Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. 'Xanthi-nc.' Phytopathology, 68:692-697.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H₂O₂ from oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell, 79:583-593.
- Loebenstein, G. 1972. Localization and induced resistance in virus-infected plants. Annual Review of Phytopathology, 10:177-206.
- Lösel, R. & Wheling, M. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. Nature Reviews of Molecular and Cell Biology, 4:46-54.
- Low, P.S. & Merida, J.R. 1996. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. Physiologia Plantarum, 96:533-542.

- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D., Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science, 250:1002-1004.
- Mauch-Mani, B. & Slusarenko, A.J. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. Plant Cell, 8:203-212.
- Mazorras, L.M., Núñez, M., Hechavarria, M., Coll, F., Sanches-Blanco, M.J. 2002. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. Biologia Plantarum, 45 (4):593-596.
- McDowell, J.M. & Dangl, J.L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. Trends of Biochemistry Science, 25:79-82.
- Mehdy, M. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiology, 105:467-472.
- Métraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E.W., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. Science, 250:1004-1006.
- Montalbini, P., Buonauro, R., Kumar, N.N.U. 1995. Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with *Tobacco necrosis virus* and other viruses inducing necrotic and non-necrotic alterations. Journal of Phytopathology, 143:295–301.
- Montoya, T., Nomura, T., Farrar, K., Kaneta, T., Yokota, T., Bishop, G.J. 2002. Cloning the tomato *Curl3* gene highlights the putative dual role of the leucine-rich repeat receptor kinase tBRI1/SR160 in plants steroid hormone and peptide hormone signaling. Plant Cell, 14:3163–3176.
- Montoya, T., Nomura, T., Yokota, T., Farrar, K., Harrion, K., Jones, J.G.D., Kaneta, T., Kamiya, Y., Szekeres, M., Bishop, G.J. 2005. Patterns of *Dwarf* expression and

- brassinosteroid accumulation in tomato reveal the importance of brassinosteroid synthesis during fruit development. Plant Journal, 42:262–269.
- Morelló, J.R., Romero, M.P., Ramo, T., Motilva, M.J. 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. Plant Science, 168:65-72.
- Moshati, F.I.B., Pike, S.M., Novacky, A.J., Sehgal, O.P. 1993. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with *Tobacco ringspot virus* or *Southern bean mosaic virus*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 43:109–119.
- Mowat, W.P. & Dawson, S. 1987. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. Journal of Virological Methods, 15:233-247.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Aria, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., Yoshida, S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. Plant Journal, 33:887-898.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessman, H., Ryals, J. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? Plant Journal, 8:227-233.
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology, 30:369-389.
- Núñez, M., Mazzafera, P., Mazorras, L.M., Siqueira, W.J., Zullo, M.A.T. 2003. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Biologia Plantarum, 47 (1):67-70.
- Ousbourn, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell, 8:1821-1831.

- Pascholati, S.F., Nicholson, R.L., Butler, L.G. 1986. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. Journal of Phytopathology, 115:165-172.
- Pascholati, S.F. 2003. Indução de Resistência Sistêmica: opção para o controle de doenças no século XXI? Summa Phytopathologica, 29:1.
- Pascholati, S.F. & Leite, B. 1994. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 2:1-52.
- Pennazio, S. & Roggero, P. 1998. Systemic Acquired Resistance Against Plant Virus Infections: A Reality? Journal of Pathology, 80 (3):179-186.
- Peyrano, G., Taleisnik, E., Quiroga, M., Forchetti, S., Tigier, H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. Plant Physiology and Biochemistry, 35(5):387-393.
- Pieterse, C.M.J. 1998. A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10:1571-1580.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B. 1997. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂ metabolising enzymes. Plant Physiology, 115:137-149.
- Ras24mussen, J.B., Hammerschmidt, R., Zook, M.N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiology, 97:1342-1347.
- Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L. & Chaves, Z.M. 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira, 28:123-130.
- Rocha, A.B. 2000. Hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida em feijoeiro Moruna nc, induzidas pelo vírus do mosaico do feijoeiro do sul dos EUA. Tese de doutorado, Unicamp.

- Ross, A.F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. Virology, 14:340-358.
- Ross, A.F. 1966. Systemic effects of local lesions formation. In: Beemster A.B.R., Dijkstra J. (eds). Viruses of plants, pp. 127-150. North-Holland, Amsterdam.
- Ross, A.F. & Bozart, R.F. 1960. Resistance induced in one plant part as a result of virus infection in another part. Phytopathology, 50:652.
- Ryals, J. A., Neuenschander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M. D., 1996. Systemic acquired resistance. Plant Cell, 8:1809-1819.
- Sandermann, H. 2000. Active oxygen species as mediators of plant immunity: Three case studies. Biol. Chem., 381:649-653.
- Scagliusi S.M.M, Vega, J., Benatti L.B. 2003. Alteração da atividade de peroxidases em folhas de cana-de-açúcar pela infecção do vírus do amarelecimento foliar. Brazilian Journal of Plant Physiology, 15:433.
- Scheer, J.M. & Ryan, C.A. Jr. 2002. The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 99:9586–9590.
- Sehgal, O.P. 1981. *Southern bean mosaic virus* Group. In: Kurstak, P. ed. Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier/North Holland, pp. 91-121.
- Shah, J., Kachroo, P., Klessig, D.F. 1999. The *Arabidopsis* *ssl* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. Plant Cell, 11:191-206.
- Shepherd, R.J. 1971. *Southern bean mosaic virus*. In: Descriptions of plant viruses. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England, n° 57.

- Shulaev, V., León, J., Raskin, I. 1995. Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? The Plant Cell, 7:1691-1701.
- Shulaev, V., Silverman, P., Raskin, I. 1997. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. Nature, 385:719–721.
- Smirnoff, N. 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annual of Botany, 78:661-669.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D.G., 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. Science, 268:661-67.
- Szekeres, M. 2003. Brassinosteroid and systemin: two hormones perceived by the same receptor. Trends in Plant Science, 8:102–104.
- Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y., Klessig, D.F. 1997. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase activity. The Plant Cell, 11:993-1005.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., William, S., Dincher S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals J. 1992. Acquired resistance in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 4:645-656.
- Uknes, S., Winter, A.M., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 6:692-698.
- Van Loon, L.C. 1983. Mechanisms of resistance in virus infected plants. In: Bailey J.A., Deverall B.J. (eds). The dynamics of host defense, pp. 123-190. Academic Press.
- Van Regemmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Cartens, E.B., Estes, M.H., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Winckner, R.B., 2000. Virus Taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.

- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. The Plant Cell, 6:959-965.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Widerhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., Ryals, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell, 3:1085-1094.
- Weete, J.D. 1992. Induced systemic resistance to *Alternaria casiae* in sicklepod. Physiological and Molecular Plant Pathology, 40:437-445.
- Whenham, R. J. & Fraser, R. S. 1990. Plant growth regulators, viruses and plant growth. In: Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. Fraser, R. S., Eds., Springer-Verlag, Berlin, 287–310.
- White, R.F. & Antoniew, J.F. 1991. Virus induced resistance response in plants. Critical reviews in Plant Science, 9:443-455.
- White, R.F. 1979. Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to *Tobacco mosaic virus* in tobacco. Virology, 99:410-412.
- Yalpani, N., Shulaev, V., Raskin, I. 1993. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. Phytopathology, 83:702–708.
- Yang, Y., Saha, J., Klessig, D.F. 1997. Signal perception and transduction in plants defense responses. Genes and Development, 11:1621-1639.
- Yi, H.C., Joo, S., Nam, K.H., Lee, J.S., Kang, B.G., Kim, W.T. 1999. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in mung bean (*Vigna radiate* L.). Plant and Molecular Biology, 41:443–454.

- Zhao, H.J., Lin, X.W., Shi, H.Z., Chang, S.M. 1995. The regulation effects of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybean. Acta Agricola Sinica, 21:351-355.
- Zullo, M.A. & Adam, G. 2002. Brassinosteroid phytohormones - structure, bioactivity and applications. Journal of Plant Physiology, 14(3):143-181.

**ANEXO I - Temperaturas máximas e mínimas (°C), e precipitação diária (mm) em Campinas.
Ano de 2004, Fonte: CIIAGRO - IAC- Campinas/SP**

Data	Max	Min	Chuva	Data	Max	Min	Chuva	Data	Max	Min	Chuva
1/4/2004	29,6	17,6	0,0	15/5/2004	19,4	16,8	1,6	28/6/2004	27,2	16,2	0,0
2/4/2004	30,4	17,8	0,0	16/5/2004	20,2	10,8	7,8	29/6/2004	27,8	16,2	0,0
3/4/2004	31,0	17,8	0,0	17/5/2004	22,6	9,4	0,0	30/6/2004	26,4	15,4	0,0
4/4/2004	26,8	19,6	0,0	18/5/2004	20,8	10,0	0,0	1/7/2004	26,6	14,2	0,0
5/4/2004	29,6	16,8	2,5	19/5/2004	24,2	12,6	2,8	2/7/2004	26,4	14,0	0,0
6/4/2004	29,0	18,8	0,0	20/5/2004	23,0	15,2	0,4	3/7/2004	26,4	14,2	0,0
7/4/2004	28,0	17,4	12,9	21/5/2004	23,8	14,8	0,0	4/7/2004	27,6	15,0	0,0
8/4/2004	31,4	17,8	0,0	22/5/2004	24,4	14,6	4,3	5/7/2004	25,2	15,8	0,0
9/4/2004	30,0	19,4	0,0	23/5/2004	22,6	15,6	0,0	6/7/2004	25,6	16,0	0,0
10/4/2004	28,6	19,0	0,0	24/5/2004	26,8	15,4	3,1	7/7/2004	27,4	14,6	0,0
11/4/2004	29,2	17,8	0,0	25/5/2004	21,8	16,8	1,8	8/7/2004	27,0	15,0	0,0
12/4/2004	29,8	19,2	0,4	26/5/2004	17,4	12,2	45,9	9/7/2004	21,4	16,4	4,4
13/4/2004	27,0	19,4	0,0	27/5/2004	18,4	7,4	0,0	10/7/2004	20,8	14,2	0,4
14/4/2004	24,0	20,4	5,4	28/5/2004	21,2	8,2	0,0	11/7/2004	19,0	13,6	42,0
15/4/2004	28,8	17,8	1,5	29/5/2004	23,6	10,8	0,0	12/7/2004	24,0	11,8	0,0
16/4/2004	26,6	18,0	2,8	30/5/2004	26,0	12,2	0,2	13/7/2004	25,2	11,6	0,0
17/4/2004	28,8	17,4	4,3	31/5/2004	22,4	14,8	0,2	14/7/2004	26,6	14,6	0,0
18/4/2004	30,4	19,0	0,0	1/6/2004	23,6	13,4	6,4	15/7/2004	27,2	14,6	0,0
19/4/2004	30,6	19,0	0,0	2/6/2004	22,4	14,0	0,0	16/7/2004	27,2	15,0	0,0
20/4/2004	27,8	18,2	16,8	3/6/2004	17,0	14,2	11,8	17/7/2004	19,6	15,2	0,3
21/4/2004	28,8	18,8	0,0	4/6/2004	19,4	11,4	25,3	18/7/2004	20,4	13,8	0,0
22/4/2004	28,8	19,4	0,0	5/6/2004	20,2	11,6	0,0	19/7/2004	15,0	13,2	3,1
23/4/2004	29,4	17,2	0,0	6/6/2004	22,2	9,4	0,0	20/7/2004	15,0	13,2	43,1
24/4/2004	26,4	18,4	0,0	7/6/2004	22,0	8,4	0,0	21/7/2004	19,6	12,2	0,4
25/4/2004	24,2	20,0	0,0	8/6/2004	24,8	9,6	0,0	22/7/2004	19,0	9,2	0,0
26/4/2004	23,6	16,2	1,0	9/6/2004	22,6	11,3	0,0	23/7/2004	18,8	9,2	0,0
27/4/2004	26,2	16,4	0,0	10/6/2004	27,2	14,2	0,6	24/7/2004	21,6	9,2	0,0
28/4/2004	26,2	15,4	0,0	11/6/2004	26,4	14,8	0,0	25/7/2004	20,8	9,8	0,0
29/4/2004	26,2	14,6	0,0	12/6/2004	17,8	15,8	0,0	26/7/2004	21,4	9,4	0,0
30/4/2004	26,2	13,4	0,0	13/6/2004	16,8	9,6	11,7	27/7/2004	23,0	9,4	0,0
1/5/2004	27,0	14,0	0,0	14/6/2004	24,0	9,6	0,0	28/7/2004	22,6	10,2	0,0
2/5/2004	28,2	15,4	0,0	15/6/2004	20,2	10,0	0,0	29/7/2004	23,2	11,0	0,0
3/5/2004	31,0	16,8	0,0	16/6/2004	25,4	11,8	2,7	30/7/2004	22,6	10,8	0,0
4/5/2004	28,8	17,4	0,0	17/6/2004	25,6	11,0	0,0	31/7/2004	25,4	11,6	0,0
5/5/2004	26,8	18,0	25,6	18/6/2004	26,0	10,0	0,0	1/8/2004	24,8	10,4	0,0
6/5/2004	23,0	18,2	3,5	19/6/2004	25,4	10,6	0,0	2/8/2004	25,6	8,2	0,0
7/5/2004	20,0	18,2	7,4	20/6/2004	25,0	12,4	0,0	3/8/2004	28,2	14,8	0,0
8/5/2004	20,4	16,4	10,8	21/6/2004	26,0	13,0	0,0	4/8/2004	27,6	14,8	0,0
9/5/2004	22,0	10,0	0,2	22/6/2004	25,6	11,0	0,0	5/8/2004	27,2	13,8	0,0
10/5/2004	23,4	11,6	0,0	23/6/2004	26,0	11,6	0,0	6/8/2004	25,6	12,4	0,0
11/5/2004	25,6	14,4	0,0	24/6/2004	25,0	13,6	0,0	7/8/2004	26,2	13,8	0,0
12/5/2004	28,2	12,8	0,0	25/6/2004	25,6	14,0	0,0	8/8/2004	20,6	13,6	0,0
13/5/2004	20,4	13,6	0,0	26/6/2004	26,2	16,8	0,0	9/8/2004	21,6	7,8	0,0
14/5/2004	23,6	16,6	0,3	27/6/2004	26,2	13,8	0,0	10/8/2004	22,8	8,4	0,0

**ANEXO II - Temperaturas máximas e mínimas (°C), e precipitação diária (mm) em Campinas.
Ano 2005, Fonte: CIIAGRO - IAC- Campinas/SP**

Data	Max	Min	Chuva	Data	Max	Min	Chuva	Data	Max	Min	Chuva
1/1/2005	32,6	19,6	0,0	14/2/2005	29,0	17,4	0,0	30/3/2005	31,2	18,4	0,0
2/1/2005	30,8	20,0	0,0	15/2/2005	29,6	16,4	0,0	31/3/2005	30,6	20,2	0,0
3/1/2005	29,8	18,8	15,1	16/2/2005	31,6	16,0	0,0	1/4/2005	31,4	20,8	0,2
4/1/2005	24,0	19,6	18,5	17/2/2005	32,4	19,0	0,0	2/4/2005	31,6	19,6	0,0
5/1/2005	27,0	19,6	64,5	18/2/2005	33,2	18,4	27,5	3/4/2005	32,2	20,4	0,0
6/1/2005	29,2	20,4	10,5	19/2/2005	32,0	20,4	11,5	4/4/2005	31,6	21,2	0,0
7/1/2005	30,0	21,4	0,0	20/2/2005	30,6	19,2	0,0	5/4/2005	29,2	21,4	25,2
8/1/2005	32,0	20,0	20,5	21/2/2005	29,4	17,2	0,0	6/4/2005	31,6	21,6	0,0
9/1/2005	29,8	21,6	0,0	22/2/2005	32,6	16,8	0,0	7/4/2005	31,6	21,6	2,8
10/1/2005	30,8	21,2	0,0	23/2/2005	33,6	18,4	0,0	8/4/2005	33,0	20,0	0,0
11/1/2005	25,2	21,8	9,1	24/2/2005	34,0	21,8	0,0	9/4/2005	32,4	21,4	6,7
12/1/2005	25,2	21,6	27,9	25/2/2005	32,4	22,4	0,0	10/4/2005	31,6	21,0	0,0
13/1/2005	30,0	21,6	0,0	26/2/2005	27,6	19,6	31,0	11/4/2005	31,4	19,6	0,0
14/1/2005	32,0	17,4	0,0	27/2/2005	29,0	20,8	5,1	12/4/2005	31,6	18,6	0,0
15/1/2005	32,2	19,8	0,0	28/2/2005	31,0	20,2	13,3	13/4/2005	30,2	19,6	0,0
16/1/2005	31,0	22,8	0,0	1/3/2005	30,4	19,4	0,0	14/4/2005	31,0	19,2	0,0
17/1/2005	27,4	21,2	0,0	2/3/2005	28,0	19,6	0,0	15/4/2005	31,4	18,4	0,0
18/1/2005	28,4	21,0	0,0	3/3/2005	28,6	18,0	0,0	16/4/2005	30,8	18,6	0,0
19/1/2005	23,8	21,2	138,5	4/3/2005	27,8	17,6	0,4	17/4/2005	31,4	20,8	0,0
20/1/2005	25,4	20,8	15,4	5/3/2005	29,2	17,8	0,0	18/4/2005	29,2	18,4	0,0
21/1/2005	27,6	21,0	11,4	6/3/2005	29,2	17,4	0,0	19/4/2005	30,0	17,8	0,0
22/1/2005	27,6	21,0	16,4	7/3/2005	29,2	18,4	0,0	20/4/2005	30,2	16,6	0,0
23/1/2005	31,4	19,0	13,3	8/3/2005	33,4	19,6	0,0	21/4/2005	29,0	18,0	0,0
24/1/2005	30,0	20,8	0,8	9/3/2005	33,0	20,8	0,0	22/4/2005	29,4	18,2	0,0
25/1/2005	29,0	21,0	1,1	10/3/2005	33,4	19,4	0,0	23/4/2005	29,0	17,8	0,0
26/1/2005	22,6	18,2	56,9	11/3/2005	33,6	21,0	0,0	24/4/2005	29,6	15,4	0,0
27/1/2005	21,4	16,6	0,0	12/3/2005	31,2	19,8	0,0	25/4/2005	24,6	17,4	0,0
28/1/2005	24,4	17,8	1,3	13/3/2005	32,6	20,2	7,0	26/4/2005	21,6	17,4	0,0
29/1/2005	24,4	19,6	10,3	14/3/2005	30,2	22,2	0,6	27/4/2005	24,2	15,0	0,0
30/1/2005	27,2	20,0	4,6	15/3/2005	28,4	20,6	107,9	28/4/2005	20,4	15,2	0,0
31/1/2005	30,0	17,8	16,7	16/3/2005	28,4	20,0	36,2	29/4/2005	26,0	15,2	6,4
1/2/2005	28,8	19,6	0,0	17/3/2005	27,6	20,2	36,6	30/4/2005	23,0	15,6	0,3
2/2/2005	29,6	19,8	0,0	18/3/2005	28,6	20,8	2,1	1/5/2005	24,0	15,0	0,0
3/2/2005	29,8	21,0	0,0	19/3/2005	30,6	18,0	0,2	2/5/2005	24,0	13,8	0,0
4/2/2005	29,0	20,8	0,0	20/3/2005	30,2	20,2	0,0	3/5/2005	25,6	14,0	0,0
5/2/2005	28,4	19,2	0,0	21/3/2005	27,2	20,2	0,0	4/5/2005	26,8	13,8	0,0
6/2/2005	27,8	18,4	0,0	22/3/2005	27,2	20,8	0,0	5/5/2005	27,0	14,0	0,0
7/2/2005	27,4	16,0	0,0	23/3/2005	29,6	20,0	84,5	6/5/2005	26,4	14,2	0,0
8/2/2005	27,8	15,6	0,0	24/3/2005	25,4	19,6	15,6	7/5/2005	27,4	14,8	0,0
9/2/2005	29,4	16,6	0,0	25/3/2005	26,4	19,6	17,0	8/5/2005	27,8	15,6	0,0
10/2/2005	29,6	16,6	0,0	26/3/2005	26,8	17,6	0,0	9/5/2005	26,8	16,6	0,7
11/2/2005	29,6	16,0	0,0	27/3/2005	29,2	17,8	0,0	10/5/2005	27,6	17,4	0,0
12/2/2005	30,4	17,6	8,4	28/3/2005	29,3	19,2	0,0	11/5/2005	29,8	16,6	0,0
13/2/2005	29,4	16,0	0,0	29/3/2005	30,4	18,2	0,0	12/5/2005	30,2	14,8	0,0