

ANDRÉA BRONDANI DA ROCHA

**HIPERSENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA SISTÊMICA  
ADQUIRIDA EM FEJÓEIRO MORUNA NC,  
INDUZIDAS PELO VÍRUS DO MOSAICO DO  
FEJÓEIRO DO SUL DOS EUA**

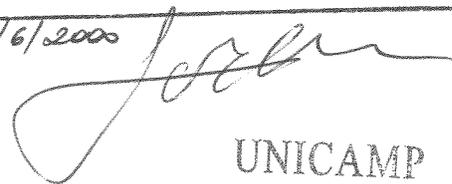
**Tese apresentada ao Instituto de Biologia para a  
obtenção do Título de Doutor em Biologia Vegetal.**

Orientador: Prof. Dr. Jorge Vega

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Andréa Brondani da Rocha  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

2000

19/6/2000



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

0780766

CHAMADA:  
TUNICAMP  
R 582h  
5/4/818  
278/00  
C  D   
RECA 2411,00  
ATA 05-08-00  
\* CPD

CM-00142790-1

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

**R582h** **Rocha, Andréa Brondani da**  
Hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida em  
feijoeiro moruna NC, induzidas pelo vírus do mosaico do  
feijoeiro do sul dos EUA/Andréa Brondani da Rocha. - -  
Campinas, SP[s.n.], 2000.  
108f. ilustr.

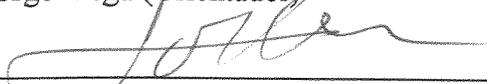
Orientador: Jorge Vega  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Hipersensibilidade. 2. Resistência sistêmica. 3. Phaseolus  
vulgaris. I. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

Data da Defesa: 19/06/2000

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Jorge Vega (Orientador)



---

Prof. Dr. José Osmar Gaspar

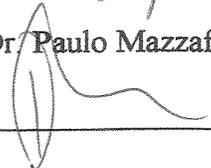
---

Prof. Dr. Ladaslav Sodek



---

Prof. Dr. Paulo Mazzafera



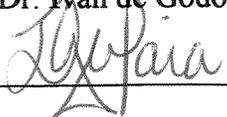
---

Profa. Dra. Marlene Aparecida Sciavinato



---

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia



---

Prof. Dr. Ivany Ferraz Valio

---

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



*Dedico esta tese à Geneci, Adriana, Débora, Márcio e Georgius; amores da minha vida.*



## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Jorge Vega, pela orientação, paciência, dedicação e pelos ensinamentos.

Agradeço aos Professores Dr. Paulo Mazzafera e Dr. Ladaslav Sodek pelos auxílios prestados para o desenvolvimento desta tese. Muito obrigada também aos demais professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos meus colegas, pelo convívio, em especial à Marluci, Carlos, Célia, Daniele, Sandra e Marcos. Aos meus amigos Luzia, Silvana e Rodrigo.

À minha família, Geneci, Adriana, Débora e Márcio, pelo apoio, compreensão e amor.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal e à todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização deste trabalho.

À UNICAMP, pela estrutura, e ao CNPq, pela bolsa concedida.



## ÍNDICE

Resumo .....	i
Summary .....	iv
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	10
3. Materiais e Métodos .....	11
4. Resultados .....	27
5. Discussão .....	67
6. Conclusões .....	90
7. Literatura citada .....	91
8. Apêndice .....	104



# HIPERSENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA EM FEIJOEIRO MORUNA NC, INDUZIDAS PELO VÍRUS DO MOSAICO DO FEIJOEIRO DO SUL DOS ESTADOS UNIDOS

## RESUMO

As plantas podem ficar sistemicamente protegidas contra diversas moléstias através de uma inoculação prévia com patógenos causadores de necrose. Este fenômeno é conhecido como resistência sistêmica adquirida. O envolvimento de vários mecanismos na indução da resistência adquirida tem sido sugerido. Entre eles estão a resposta de hipersensibilidade, aumento na atividade da peroxidase, e o aumento no conteúdo de ácido salicílico nas folhas resistentes.

Esta tese teve como objetivos caracterizar o fenômeno da resistência adquirida em plantas de feijoeiro Moruna nc inoculadas com o vírus VMFS-EUA, quanto à ocorrência da reação de hipersensibilidade; efeito do número de lesões necróticas necessárias para a indução da resistência; efeito de condições ambientais (radiação e temperatura), duração do fenômeno e efeito da nodulação por *Rhizobium tropici*; avaliar os processos bioquímicos envolvidos na resistência adquirida, tais como peroxidação de lipídeos, atividade enzimáticas (catalase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase) e o envolvimento do ácido salicílico; e estudar o efeito da aplicação de citocininas, ácido salicílico e benzotiadiazole sobre a resposta de hipersensibilidade e a expressão da resistência sistêmica adquirida. Para tanto, na maioria dos experimentos (exceção aos experimentos em que foi estudada a influência do número de lesões ocorridas na indução na expressão da resistência), o feijoeiro Moruna nc foi inoculado na folha primária com o vírus VMFS-EUA purificado, na concentração de 10 µg/mL.

Geralmente a reação de hipersensibilidade ocorreu 72 horas após esta inoculação (inoculação de indução). A planta inoculada recebeu outra inoculação (de desafio) com a mesma concentração de VMFS-EUA, na 2ª folha trifoliolada. Quatro dias após esta última inoculação, foram realizados os ensaios enzimáticos e as outras determinações bioquímicas em ambas as folhas, induzida e desafiada.

Nos experimentos em que foi estudada a influência do número de lesões ocorridas na indução na expressão da resistência adquirida, verificou-se que o aumento na concentração viral de 1,7 para 20 µg/mL durante a inoculação de indução resultou em menos lesões ocorridas no desafio, tanto nos experimentos realizados em casa de vegetação como em câmara de crescimento. As mudanças realizadas experimentalmente na radiação luminosa incidente não resultaram em alterações na expressão da resistência adquirida. No entanto, o aumento na temperatura de 20°C para 30°C causou uma redução no número e tamanho de lesões ocorridas no desafio. De um modo geral, a resistência adquirida teve duração de 13 a 22 dias após a indução da mesma. Não foi observado efeito da nodulação na expressão da resistência adquirida.

Malondialdeído, um produto da peroxidação de lipídeos, esteve relacionado com a resposta de hipersensibilidade. Não foi observado aumento na atividade da enzima catalase em relação à ocorrência de resistência adquirida. A atividade da peroxidase aumentou de aproximadamente 3 para 15 unidades (expressas em  $\Delta\text{Abs}_{470}/\text{min.g}$  massa fresca) durante a expressão da resistência sistêmica adquirida. A enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) também apresentou aumento de atividade nas plantas que estavam expressando resistência (uma média de 7 U.A.<sub>290</sub>/h. g massa fresca x100. nas folhas não induzidas e 27 U.A.<sub>290</sub>/h.g massa fresca x 100 nas folhas com resistência adquirida). O conteúdo de ácido salicílico nas

folhas com resistência induzida aumentou mais de 30 vezes durante a ocorrência da resistência no feijoeiro Moruna nc.

O tratamento de aplicação de citocinina permitiu maior replicação viral, monitorada pelo teste PTA-ELISA, tanto nas plantas de uma variedade que permite a invasão sistêmica (cultivar Jalo), como na variedade Moruna nc. Já as folhas tratadas com ácido salicílico apresentaram redução na replicação viral. A aplicação do ácido salicílico induziu resistência sistêmica a partir de doze horas após sua aplicação, evidenciada pela redução de 15 lesões/cm<sup>2</sup> de folha, no controle, para 2 lesões/cm<sup>2</sup> de folha nas folhas tratadas.

O benzotiadiazole (sob a forma do produto comercial BION), produto indutor de resistência análogo ao ácido salicílico, induziu resistência nos feijoeiros quando aplicado nas doses de 2,5 e 5 g/100L. Doses maiores do produto causaram sintomas de toxidez nas plantas. Peroxidase teve sua atividade aumentada nas plantas tratadas com o produto, mas a enzima PAL não apresentou tal comportamento. O produto conferiu resistência às plantas durante o período de nove dias.

O trabalho permite concluir que o número e tamanho das lesões causadas pelo VMFS-EUA na indução foram afetados pela temperatura, e foram fatores determinantes para a ocorrência da resistência adquirida. As enzimas peroxidase e PAL foram associadas aos processos bioquímicos que possibilitaram a ocorrência da resistência sistêmica. O ácido salicílico também esteve envolvido na expressão de resistência sistêmica adquirida em plantas de feijoeiro Moruna nc inoculadas com VMFS-EUA

# **HYPERSENSITIVE RESPONSE AND SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE IN MORUNA BEAN INOCULATED WITH SOUTHERN BEAN MOSAIC VIRUS**

## **SUMMARY**

Plants can be systemically protected against diseases by prior inoculation with necrotizing pathogens or physiological/biochemical stresses. This phenomenon has been termed systemic acquired resistance (SAR). Several mechanisms have been suggested to contribute to plant induced resistance. They include the hypersensitive response (HR), enhanced systemic extracellular peroxidase activity, and the involvement of salicylic acid.

The purposes of this work were to characterize SAR in Moruna bean inoculated with Southern Bean Mosaic Virus (SBMV) in relation to the HR occurrence; study the effect of lesion number necessary to induce SAR; study the effects of light radiation and temperature; evaluate time extension and effect of *Rhizobium tropici* nodulation; study biochemical processes involved with SAR, such as lipid peroxidation, enzymatic activities (catalase, peroxidase, and PAL) and the involvement of salicylic acid; and finally study the effects of cytokinin, salicylic acid and benzothiadiazole application in the HR and SAR expression. In most of the experiments (except for those where the effect of lesion number necessary to induce SAR was studied) Moruna bean was inoculated on the primary leaves with purified SBMV at the concentration of 10 µg/mL. It usually showed HR 72 hours after this inoculation. Inoculated plants were challenged with the same concentration of SBMV on the second trifoliate leaf. Four days after challenge, enzymatic assays and other biochemical assays were performed on both induced and challenged leaves.

In the experiments where the effect of lesion number necessary to induce SAR was studied, increasing SBMV concentration from 1.7 to 20 µg/mL as the inducing inoculum

resulted in the development of fewer lesions at challenge in both greenhouse and growth chamber experiments. Changes in incident light radiation did not modify the pattern of SAR expression, but increase of temperature from 20°C to 30°C caused a reduction in both number and lesion size at challenge. In general, SAR was expressed during 13 to 22 days. No nodulation effects were observed on the expression of SAR.

Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, was associated with HR. No changes in catalase activity were observed in relation to SAR. Peroxidase activity increased from approximately 3 to 15 units (expressed in  $\Delta\text{Abs}_{470}/\text{min.g}$  fresh weight) during SAR expression. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) also showed enhanced activity in the induced leaves (an average of 7 U.A.<sub>290</sub>/ h. g fresh weight x100 in non-induced leaves, and 27 U.A.<sub>290</sub>/ h. g fresh weight x 100 in SAR expressing leaves). Salicylic acid content on the induced leaves increased up to 30 fold during SAR expression in Moruna bean.

Leaves treated with cytokinin showed increased virus replication, measured by PTA-ELISA, both for plants that permit systemic spread (Jalo) as for Moruna nc. On the other hand, leaves sprayed with salicylic acid presented less virus replication. Treatment with salicylic acid induced systemic resistance after 12 hours, showing a reduction from 15 lesions/cm<sup>2</sup> (control) to 2 lesions/cm<sup>2</sup> (treated leaves).

Benzothiadiazole (which commercial product is called BION), an analog of salicylic acid, induced resistance in bean when it was applied at 2.5 and 5 g/100 L. Higher amounts of this product were toxic to the plants. Peroxidase activity was higher in plants treated with BTH than in the control, but PAL did not show this increase in activity. Plants treated with BTH remained resistant to SBMV during 9 days.

We conclude that number and lesion size caused by SBMV at induction were affected by temperature, and were important for SAR occurrence. Extracellular peroxidase and PAL

were associated with the biochemical processes leading to resistance. Salicylic acid was also related to induced resistance of Moruna bean plants inoculated with SBMV.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas estão sendo constantemente expostas aos mais diversos patógenos, mas o desenvolvimento das moléstias nem sempre ocorre. Existem três motivos para ocorrer a incompatibilidade: (1) ou a planta é incapaz de fornecer todas as condições necessárias para a sobrevivência do patógeno e portanto não se constitui numa planta hospedeira; (2) ou a planta possui barreiras estruturais pré-formadas e/ou compostos tóxicos que confinam infecções bem sucedidas de patógenos específicos; e (3) após o reconhecimento do ataque do patógeno, mecanismos de defesa podem ser ativados e a invasão se mantém localizada. Destes três tipos de interação, apenas na última forma de resistência os mecanismos de defesa dependem da indução.

As reações de incompatibilidade são freqüentemente associadas ao aparecimento de lesões necróticas contendo células mortas no sítio de entrada do patógeno. Classicamente esta resposta da planta ao ataque de patógenos é conhecida como hipersensibilidade (HR) e ocorre poucas horas após o ataque do patógeno (Agrios, 1998). Na prática, HR é caracterizada por restringir o crescimento e/ou espalhamento do patógeno (Durner *et al.*, 1997).

Há várias combinações de vírus/ plantas hospedeiras nas quais a planta responde à inoculação foliar com a formação de lesões locais, grupos de células no sítio de infecção que apresentam sinais visíveis de alterações metabólicas, podendo inclusive culminar na morte programada das células. Se a reação for de hipersensibilidade, estas áreas se tornam necróticas, e o vírus fica restrito às células necrosadas e às células imediatamente adjacentes, não ocorrendo, portanto, o espalhamento do patógeno e o desenvolvimento da moléstia (Goodman

*et al.*, 1986). Este é o caso das plantas de feijão Moruna nc, quando inoculadas com o vírus do mosaico do feijoeiro do Sul dos Estados Unidos (VMFS-EUA) (Cupertino *et al.*, 1980).

A resposta de hipersensibilidade é considerada uma forma de resistência, e é comumente determinada por um único gene dominante presente no genótipo vegetal (Dawson & Hilf, 1992). 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 destes processos rápidos é a liberação de formas ativas de oxigênio (Mehdy, 1994). Este surto oxidativo precede e posteriormente acompanha a morte celular da planta hospedeira, associada à lesão (Mehdy *et al.*, 1996).

As formas ativas de oxigênio são intermediários tóxicos que resultam de sucessivos passos na redução do O<sub>2</sub> molecular. O surto oxidativo está correlacionado com a resposta de hipersensibilidade em diversas espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas, incluindo arroz, fumo e soja. As espécies predominantes das formas ativas de oxigênio detectadas nas interações planta/patógeno são o íon superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxila (OH<sup>\*</sup>) (Mehdy, 1994). São todos extremamente tóxicos, pois podem reagir indiscriminadamente com os componentes celulares, o que provoca uma cascata de reações oxidativas que resultam na quebra de DNA, degradação de proteínas e pigmentos, peroxidação de lipídeos de membranas e inativação de enzimas.

Um mecanismo capaz de auxiliar as plantas contra os danos causados pelas espécies ativas de oxigênio é o aumento da atividade das enzimas antioxidantes, que fazem a diminuição destes radicais livres. Entre estas enzimas, estão a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (PER) e as enzimas do ciclo glutationa/ascorbato (Purvis & Shewfelt, 1993). SOD é a primeira enzima do processo de desintoxicação. Ela converte os radicais O<sub>2</sub><sup>-</sup>

em  $H_2O_2$ . CAT, ascorbato peroxidase e outras peroxidases catalizam a quebra do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . No ciclo glutationa/ascorbato a ação enzimática da ascorbato peroxidase reduz  $H_2O_2$  usando ascorbato como doador de elétrons (Queiroz, 1997).

Em um estudo de interação entre fumo e o vírus do mosaico do fumo (TMV),  $O_2^-$  foi detectado em discos foliares sob reação de hipersensibilidade. E ao contrário, pouco  $O_2^-$  foi produzido nos discos foliares não infectados ou sob invasão sistêmica (Doke & Ohashi, 1988).

Em adição à resistência pelo mecanismo de hipersensibilidade, as células da planta respondem à infecção viral induzindo resistência mais duradoura a futuros desafios de patógenos, tanto no sítio primário de infecção como em partes não infectadas da planta, sendo isto chamado resistência sistêmica adquirida ("systemic acquired resistance", SAR). A SAR refere-se a um sinal de transdução distinto, que desempenha importante papel na habilidade das plantas em defender-se contra os patógenos. Após a formação da 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.*, 1996).

A primeira evidência convincente de que as plantas podem desenvolver a SAR aos patógenos foi obtida em experimentos realizados com fumo. O patógeno *Peronospora tabacina* normalmente infecta as folhas de fumo, causando míldio. A inoculação dos tecidos do caule induz resistência ao míldio nas folhas localizadas acima do sítio de infecção (Cruickshank & Mandryk, 1960, citados por Lucas, 1999). O desenvolvimento das lesões locais necróticas devido à penetração do patógeno nos tecidos do caule parece ser importante para a indução de resistência, pois a injeção do inóculo denaturado por calor ou sonicação não foi efetiva (Cohen & Kuc, 1981). A proteção se desenvolve em um período superior a três semanas seguidos à

inoculação de indução, e é altamente efetiva, reduzindo a infecção acima de 90%, quando comparada com as plantas não induzidas. Neste sistema, a proteção é de longa duração, permanecendo ativa durante o período de crescimento da planta. No entanto, a resistência induzida não é transmitida pelas sementes (Lucas, 1999)

Ross (1961, citado por Lucas, 1999) demonstrou que a inoculação de uma folha de determinada cultivar de fumo que apresentava resistência localizada ao vírus TMV, aumentou a resistência de outras folhas na mesma planta ao TMV. A resistência sistêmica adquirida foi expressa através da redução no número e tamanho das lesões produzidas. Trabalhos posteriores mostraram que a inoculação de indução não apenas ativou a resistência ao próprio TMV, como também a outros patógenos tais como fungos e bactérias (McIntyre *et al.*, 1981).

Em uma série de artigos, foi demonstrada a ocorrência de resistência sistêmica adquirida à antracnose em feijão (Elliston *et al.*, 1971) e pepino inoculado com *Colletotrichum lagenarium* (Hammerschmidt *et al.*, 1976; Kuc & Richmond, 1977). Atualmente, o espectro biológico de proteção conferida pela resistência sistêmica adquirida inclui patógenos tão diversos quanto os fungos causadores de manchas foliares, bactérias causadoras de murcha foliar, vírus que causam necrose e mosaico (Lucas, 1999).

Até os dias atuais, a resistência sistêmica adquirida tem sido um fenômeno descrito em pelo menos 20 espécies de plantas de seis famílias diferentes (Sticher *et al.*, 1997). Alguns tipos de resistência sistêmica foram demonstrados também em ácaros e insetos (Karban & Carey, 1984; Ryan, 1990). No entanto, questões importantes permanecem obscuras, tais como, quais mecanismos são realmente responsáveis pela indução e expressão da resistência sistêmica adquirida; e se este fenômeno ocorre da mesma forma nas diferentes espécies vegetais.

Enquanto na resistência do tipo gene-a-gene, a planta é suscetível ou resistente a determinada raça do patógeno, a resistência sistêmica adquirida confere proteção quantitativa a um amplo espectro de patógenos. O tempo necessário para o estabelecimento da resistência adquirida depende tanto da espécie vegetal quanto do tipo de organismo indutor. Uma indução muito rápida foi observada em pepino, onde a resistência foi conferida 7 horas após a inoculação com *Pseudomonas syringae* (Smith & Métraux, 1991). O nível de proteção pode variar dependendo do organismo usado para a inoculação de indução, e particularmente da extensão da necrose causada por este organismo (Madamanchi & Kuc, 1991). Embora os parâmetros que são críticos para a indução da resistência ainda que não sejam bem definidos e entendidos, é de consenso que a inoculação de indução é responsável pela ocorrência da resposta de hipersensibilidade e o grau de ocorrência da mesma é fator determinante da expressão da resistência sistêmica adquirida (Sticher *et al.*, 1997).

Um grande número de evidências sugere que o ácido salicílico ("salicylic acid", SA) desempenha uma importante função na transdução de sinal da SAR. Inicialmente foi observado que o nível de SA aumentou centenas de vezes em plantas de fumo e de pepino após a infecção de vírus TMV, e este aumento demonstrou estar correlacionado com a SAR (Métraux *et al.*, 1990; Rasmussem *et al.*, 1991). A partir destes relatos, uma quantidade considerável de trabalhos têm confirmado a relação existente entre ácido salicílico e resistência sistêmica adquirida (Uknes *et al.*, 1993; Yalpani *et al.*, 1993; Cameron *et al.*, 1994). No entanto, o mecanismo pelo qual o ácido salicílico induz esta resistência ainda não está totalmente esclarecido.

Uma possível função exercida pelo ácido salicílico é a sua ligação e inativação de uma isoforma da enzima CAT, proposta por Chen *et al.* (1993). Neste trabalho, foi sugerido que o

papel do ácido salicílico na transdução de sinal seria o de inibir a atividade da CAT, levando a um aumento nos níveis de  $H_2O_2$ , o qual por sua vez funcionaria como um mensageiro secundário do ácido salicílico. Entretanto, resultados obtidos em outros experimentos contestam tal observação (Neuenchwander *et al.*, 1995; Vernooij *et al.*, 1995).

Recentemente foi demonstrado que níveis elevados de  $H_2O_2$ , e tratamento com ozônio ou raios ultravioleta estimulam a biossíntese de ácido salicílico (León *et al.*, 1995; Summermatter *et al.*, 1995).

Se o mecanismo pelo qual o ácido salicílico induz respostas de defesa não é através do aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , causado pela inibição das enzimas catalase e ascorbato peroxidase, como o sinal deste regulador de crescimento é percebido e transmitido? Uma possibilidade é através da geração de radicais de ácido salicílico, subprodutos da interação do ácido salicílico com a catalase e peroxidases (Durner & Klessig, 1996).

Dada a sua importância na resistência vegetal, a rota biossintética do ácido salicílico pode representar um ponto de controle das respostas de defesa vegetal. A biossíntese de ácido salicílico parece começar com a conversão da fenilalanina a ácido trans-cinâmico (t-CA), reação catalisada pela enzima fenilalanina amônia-liase (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). Tanto o ácido benzóico como o ácido salicílico podem ser conjugados à glicose. O aumento nas formas livres de ácido benzóico e ácido salicílico está correlacionado com o decréscimo dos níveis da forma conjugada de ácido benzóico (Yalpani *et al.*, 1993).

O envolvimento da enzima 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. Uma vez que a PAL catalisa o primeiro passo da biossíntese de ácido salicílico, e a resistência pode ser restabelecida em plantas com atividade da PAL inibida através de tratamento com ácido salicílico exógeno, o aumento na suscetibilidade é provavelmente causado por um bloqueio na síntese de ácido salicílico.

Embora o ácido salicílico pareça ser necessário para a ocorrência da resistência sistêmica adquirida, análises de mutantes e plantas transgênicas têm sugerido que o mesmo não é um requisito absoluto para a resposta de hipersensibilidade (Dangl *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996).

Tem sido relatado que em alguns casos a expressão dos genes que codificam para as proteínas relacionadas à resistência (PRs) e para a resistência em si, pode ser ativada de maneira independente de ácido salicílico (Hammond- Kosack & Jones, 1996; Pieterse *et al.*, 1996), mesmo que o ácido salicílico e a rota de transdução de sinal em que ele está envolvido estejam relacionados à resistência a vários patógenos.

Desde os anos 60 tem sido observado que a resistência vegetal pode ser modificada por citocininas. Foi verificado que ocorreu supressão da resposta de hipersensibilidade de plantas de tomate infectadas por *Meloidogyne incognita* (Dropkin *et al.*, 1969) e fumo inoculado com *Pseudomonas tabaci* (Novacky, 1972), quando estas plantas foram tratadas com citocininas. Estes relatos sugerem que as citocinas podem atenuar a resposta de hipersensibilidade a fungos, bactérias e nematóides patogênicos. No entanto, os estudos sobre efeito de citocininas na indução à resistência de fumo infectado com TMV indicaram resultados contrários aos observados nos trabalhos anteriores (Király & Szirmai, 1964). Em estudo com feijoeiro *Moruna* nc hipersensível ao VMFS-EUA, Vega (1995) verificou que a aplicação de 6-

benzilaminopurina incrementou o número de lesões locais necróticas. Para o autor, é provável que este aumento das lesões esteja relacionado a uma maior replicação inicial do vírus. Já segundo Beckman & Ingram (1994) deve haver uma ligação mecânica entre resistência e senescência, ou seja, a idade fisiológica da planta deve influenciar na resposta de hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida.

Há evidências de que produtos da peroxidação de lipídios, tal como o ácido jasmônico, podem agir como sinalizadores intracelulares que levam à ativação da resistência (Mehdy *et al.*, 1996). Além disto, há várias substâncias químicas que tem sido relatadas como indutoras de resistência sistêmica quando aplicadas nas plantas (Kesmann *et al.*, 1994). Uma delas é o CGA 245704 (benzo[1,2,3]tiadiazole-7-ácido 7-carbotioico S-metil ester) ou BTH, cujo produto comercial é o BION, e que é produzido pela empresa Novartis. Este produto encontra-se em fase de testes em diversas culturas no mundo, e tem apresentado resultados promissores na indução de SAR.

Por outro lado, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, bactérias que formam nódulos em raízes das leguminosas e são responsáveis pela fixação de nitrogênio. A sua associação com as leguminosas se constitui numa interação planta-micróbio especial (simbiose), que não induz uma resposta de defesa da planta. Vários genes bacterianos são responsáveis pelo sucesso na interação com a hospedeira. Estes são, por exemplo, os genes de nodulação (*nod*), e os genes envolvidos na síntese de exopolissacarídeo (*exo*) e lipopolissacarídeo (*lps*) (Spaink, 1995). Embora as funções dos genes *exo* e *lps* na nodulação não sejam muito claras, vários estudos sugerem um papel no controle da resposta de defesa da planta hospedeira (Niehaus *et al.*, 1993; Perotto *et al.*, 1994). Os fatores *Nod* também podem desempenhar um importante papel no controle da defesa, pois foi sugerido que podem agir como elicitores da

síntese de fitoalexinas (Savouré *et al.*, 1997). Além disto, Vasse *et al.* (1993) demonstraram que numa interação de compatibilidade com vírus, a bactéria noduladora induziu a uma reação de hipersensibilidade, transformando-a em interação de incompatibilidade. Os autores então sugeriram que a infecção com bactérias noduladoras pode fazer parte do mecanismo que confere resistência a infecções. McKhann *et al.* (1997), estudando a expressão de genes na síntese da enzima PAL, observaram que de alguma forma as bactérias noduladoras inibem o início do processo da resposta de defesa das plantas.

Desta forma, é possível verificar que existem muitos fatores fisiológicos e bioquímicos que afetam a resposta de hipersensibilidade e a resistência sistêmica adquirida. O entendimento das alterações bioquímicas que levam ao estado de resistência adquirida poderão permitir tanto o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com aumento de resistência a moléstias, como a geração de produtos químicos, com um novo modo de ação, que estimulem os mecanismos de resistência de plantas.



## 2. OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivos:

- Caracterizar o fenômeno da resistência adquirida em plantas de feijoeiro Moruna ne inoculadas com o vírus VMFS-EUA, quanto à ocorrência da reação de hipersensibilidade, efeito de condições ambientais, duração do fenômeno e efeito da nodulação por *Rhizobium tropici*;
- Avaliar os processos bioquímicos envolvidos na resistência adquirida, tais como peroxidação de lipídeos, atividades enzimáticas (catalase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase) e o envolvimento do ácido salicílico;
- Estudar o efeito da aplicação de citocininas, ácido salicílico e benzothiadiazole sobre a resposta de hipersensibilidade e a expressão da resistência sistêmica adquirida.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e vírus

O modelo para o estudo da resistência adquirida foi composto por feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) da variedade Moruna nc, que apresenta a característica de reação de hipersensibilidade ao vírus do Mosaico do Feijoeiro do Sul dos Estados Unidos (VMFS-EUA). Sementes desta variedade de feijão foram cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas, Estado de São Paulo. O vírus utilizado neste estudo é um isolado do VMFS-EUA obtido na UNESP/São José do Rio Preto, e que possui a característica de causar um discreto mosaico e enrugamento das folhas de plantas de feijoeiro que são suscetíveis a este vírus (feijoeiro cultivar Jalo).

#### 3.2. Caracterização do modelo de resistência quanto à ocorrência da reação de hipersensibilidade, efeito de condições ambientais, duração do fenômeno e efeito da nodulação por *Rhizobium tropici*.

##### 3.2.1. Efeito do número de lesões locais necróticas na indução da resistência adquirida

As plantas de feijão da variedade Moruna nc foram cultivadas em substrato vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Um lote destas plantas foi mantido em câmara de crescimento, com 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), fotoperíodo de 12 horas, e temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Outro lote foi cultivado em casa de vegetação durante os meses de

setembro e outubro de 1997. Informações à respeito da temperatura ocorrida nestes meses estão presentes no apêndice 1.

O vírus VMFS-EUA foi mantido no feijoeiro do cultivar Jalo, e purificado segundo metodologia proposta por Hull (1977). Este vírus foi inoculado mecanicamente numa metade de cada uma das duas folhas primárias do feijoeiro Moruna nc, em tratamentos de diferentes concentrações (20 µg/mL; 10 µg/mL; 5 µg/mL; 2,5 µg/mL e 1,7 µg/mL). A inoculação mecânica constituiu-se na aplicação de carborundo e uma mistura composta pelo vírus purificado, tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 e sulfito de sódio 20 mM. Vinte e quatro horas após o surgimento das primeiras lesões necróticas (que ocorreu geralmente 72 horas após a inoculação), foi realizada a inoculação de desafio na outra metade de cada uma das folhas primárias com o vírus VMFS-EUA, na concentração de 10 µg/mL. Nos tratamentos controle, a inoculação de indução foi realizada somente com o tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 + sulfito de sódio 20 mM e carborundo, e a inoculação de desafio foi efetuada com o vírus (10 µg/mL). Quatro dias após a inoculação de desafio, foi realizada a determinação do número de lesões/cm<sup>2</sup> de folha, mediante a amostragem da região média entre a nervura central e a margem da folha, de três porções de 1 cm<sup>2</sup> de cada meia-folha primária. Foram utilizadas 18 repetições.

Em outros experimentos, o vírus purificado foi inoculado mecanicamente nas duas folhas primárias inteiras (nas mesmas concentrações descritas anteriormente), constituindo a inoculação de indução. Vinte e quatro horas após o surgimento das primeiras lesões necróticas, o vírus foi inoculado na segunda folha trifoliolada da mesma planta, na concentração de 10 µg/mL (inoculação de desafio). Da mesma forma, aos quatro dias após a inoculação de desafio,

foram contadas as lesões/cm<sup>2</sup> de três amostras escolhidas aleatoriamente de cada folha primária e folíolos constituintes da segunda folha trifoliolada.

### **3.2.2. Efeito da radiação luminosa na indução da resistência adquirida**

As plantas de feijão da variedade Moruna nc foram cultivadas em substrato vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Os tratamentos consistiram de: 1) Plantas cultivadas em pleno sol (média de 1936  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  de PAR ao meio-dia); 2) Plantas cultivadas sob uma camada de sombrite (média de 920  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  de PAR ao meio-dia) ; 3) Plantas cultivadas sob 3 camadas de sombrite (média de 173  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  de PAR ao meio-dia); 4) Plantas cultivadas em câmara de crescimento, com 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  de PAR, fotoperíodo de 12 horas, e temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; e 5) Plantas cultivadas nas mesmas condições anteriores (4), nas quais foi realizada somente a inoculação de desafio (plantas controle).

O fluxo da radiação luminosa dos diversos tratamentos foi medida durante três dias consecutivos no decorrer do experimento, mediante a utilização de um sensor pontual de radiação acoplado à um “datalogger” (modelo LI-1000, LICOR). Tais parâmetros estão presentes no apêndice 2.

Nos tratamentos 1 a 4 , o vírus VMFS-EUA purificado foi inoculado mecanicamente nas duas folhas primárias do feijoeiro Moruna nc, na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tal inoculação mecânica constitui-se na aplicação de carborundo e uma mistura composta pelo vírus purificado, tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 e sulfito de sódio 20 mM. Vinte e quatro horas após o surgimento das primeiras lesões necróticas foi realizada a inoculação de desafio na segunda folha trifoliolada, na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . No tratamento controle

(5), a inoculação de indução foi realizada somente com o tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 + sulfito de sódio 20 mM e carborundo, e a inoculação de desafio foi efetuada com o vírus (10 µg/mL). Quatro dias após a inoculação de desafio, foi realizada a determinação do número de lesões/cm<sup>2</sup> de folha, mediante a amostragem aleatória de três porções de 1 cm<sup>2</sup> de cada folha primária e folíolo da segunda folha trifoliolada.

### **3.2.3. Efeito da temperatura na indução da resistência adquirida**

As plantas de feijão da variedade Moruna nc foram cultivadas em casa de vegetação, substrato vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Quando apresentaram a primeira folha trifoliolada totalmente expandida, as plantas foram transferidas para câmaras FANEM 347F, 150 µmol/m<sup>2</sup>.s de PAR, 12 horas de fotoperíodo e diferentes tratamentos de temperatura: 1) Plantas cultivadas a 15<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C; 2) Plantas cultivadas a 20<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C; 3) Plantas cultivadas a 25<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C; e 4) Plantas cultivadas a 30<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C.

O vírus VMFS-EUA purificado foi inoculado mecanicamente na metade de cada uma das duas folhas primárias (sistema meia-folha) em um lote de plantas e nas duas folhas primárias inteiras (sistema sistêmico) em outro lote de plantas de Moruna nc, na concentração de 10 µg/mL. Tal inoculação mecânica constituiu-se na aplicação de carborundo e uma mistura composta pelo vírus purificado, tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 e sulfito de sódio 20 mM. Vinte e quatro horas após o surgimento das primeiras lesões necróticas foi realizada a inoculação de desafio da outra metade das folhas primárias (sistema meia-folha) e da segunda folha trifoliolada (sistema sistêmico), na concentração de 10 µg/mL. Nos tratamentos controle, foi realizada a inoculação de indução somente com o tampão fosfato de potássio 20 mM, pH

7,0 + sulfito de sódio 20 MM e carborundo, e posteriormente foi realizada a inoculação de desafio com o vírus na concentração de 10 µg/mL. Quatro dias após a inoculação de desafio, foi realizada a determinação do número de lesões/cm<sup>2</sup> de folha, mediante a amostragem aleatória de três porções de 1 cm<sup>2</sup> de cada folha primária e folíolo da segunda folha trifoliolada. Neste momento também foi determinado o diâmetro das lesões locais produzidas, com o auxílio de uma lupa estereoscópio e uma régua milimetrada, realizando-se uma amostragem de 10 lesões por folha primária e por folíolo da segunda folha trifoliolada.

No final do experimento, foi realizada a determinação da altura das plantas; as folhas primárias foram coletadas, avaliada sua área foliar com o auxílio de um “scanner” e posteriormente estas folhas foram colocadas para secar na estufa a 65<sup>o</sup>C .

No caso das plantas mantidas a 15<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C, devido ao fato de não ter sido observada a formação de lesões locais na inoculação de indução, as plantas foram transferidas para a câmara de crescimento (25<sup>o</sup>C) aos três dias após tal inoculação, no intuito de se verificar a possibilidade de ocorrer a formação das lesões em uma temperatura mais elevada. Outro lote de plantas mantidas a 15<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C tiveram seu crescimento e desenvolvimento medido.

#### **3.2.4. Duração da indução da resistência adquirida**

As plantas de feijão da variedade Moruna nc foram cultivadas em substrato vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Tais plantas foram mantidas na câmara de crescimento, com 120 µmol/m<sup>2</sup>.s de PAR, fotoperíodo de 12 horas, e temperatura constante de 25<sup>o</sup>C ± 2<sup>o</sup>C.

O vírus VMFS-EUA purificado foi inoculado mecanicamente em metade de cada uma das duas folhas primárias do feijoeiro Moruna nc, na concentração de 10 µg/mL. Tal

inoculação mecânica constituiu-se na aplicação de carborundo e uma mistura composta pelo vírus purificado, tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 e sulfito de sódio 20 mM. A inoculação de desafio da outra metade das folhas primárias foi realizada na concentração viral de 10 µg/mL, a partir de quatro dias após a inoculação de indução, em intervalos de 24 horas até o oitavo dia após a indução, e depois aos 13 e aos 22 dias. Quatro dias após cada inoculação de desafio foi efetuada a determinação do número de lesões/cm<sup>2</sup> de folha, mediante a amostragem aleatória de três porções de 1 cm<sup>2</sup> de cada meia-folha.

Nos tratamentos controle foi realizada a inoculação de indução somente com o tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 + sulfito de sódio 20 mM e carborundo, e posteriormente foi realizada a inoculação de desafio com o vírus (10 µg/mL).

Em outro lote de plantas, o vírus purificado foi inoculado mecanicamente nas duas folhas primárias inteiras, constituindo a inoculação de indução. A inoculação de desafio na segunda folha trifoliolada foi realizada de modo similar ao descrito anteriormente. Da mesma forma, aos quatro dias após a inoculação de desafio, foram contabilizadas as lesões formadas/cm<sup>2</sup> de cada três amostras escolhidas aleatoriamente de cada folha primária e folíolo constituinte da segunda folha trifoliolada.

### **3.2.5. Efeito da nodulação por *Rhizobium tropici* na indução da resistência adquirida**

As sementes de feijoeiro Moruna nc foram colocadas para germinar em vermiculita, em casa de vegetação. Logo após a emergência das plântulas, estas foram inoculadas, ou não, com *Rhizobium tropici* SMS 731, obtido no Instituto Agronômico de Campinas. As plantas foram transferidas para câmara de crescimento, com 120 µmol/m<sup>2</sup>.s de PAR, fotoperíodo de 12 horas,

e temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Estas plantas foram cultivadas em vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução de Hoagland sem nitrogênio (plantas inoculadas) ou completa (plantas não inoculadas) (Hoagland & Arnon, 1938).

O vírus VMFS-EUA purificado foi inoculado mecanicamente nas folhas primárias dos feijoeiros, na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  (inoculação de indução). Nas plantas controle foi aplicado carborundo e tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 + sulfito de sódio 20 mM. Vinte e quatro horas após o surgimento das primeiras lesões necróticas, em alguns dos tratamentos, a segunda folha trifoliolada destas mesmas plantas foi inoculada com o vírus, na mesma concentração utilizada anteriormente (inoculação de desafio) (tabela 1). Quatro dias após esta última inoculação, foi realizada a determinação do número de lesões/ $\text{cm}^2$  de cada folha ou folíolo. Por último, foram determinados o número e a massa dos nódulos produzidos por planta inoculada com *Rhizobium tropici*.

Tabela 1. Tratamentos aplicados no feijoeiro Moruna nc, experimento de estudo do efeito da nodulação por *Rhizobium tropici* na indução da resistência adquirida.

Tratamentos	Indução	Desafio
Controle, planta não inoculada	não	não
Controle, planta inoculada	não	não
Planta não inoculada	não	sim
Planta não inoculada	sim	não
Planta não inoculada	sim	sim
Planta inoculada	não	sim
Planta inoculada	sim	não
Planta inoculada	sim	sim

### 3.3. Caracterização bioquímica do modelo de resistência sistêmica adquirida em feijoeiro Moruna nc inoculado com o vírus VMFS-EUA

#### 3.3.1. Determinações bioquímicas

Plantas de feijoeiro Moruna nc e Jalo foram cultivadas em substrato vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Tais plantas foram mantidas em câmara de crescimento, com 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$  de PAR, fotoperíodo de 12 horas, e temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Os tratamentos constaram de: 1) Plantas controle, sadias; 2) Aplicação de tampão fosfato de potássio + sulfato de sódio e carborundo na folha primária; 3) Aplicação de tampão

fosfato de potássio + sulfito de sódio e carborundo na segunda folha trifoliolada; 4) Indução com vírus; 5) Desafio com vírus; 6) Indução e desafio com vírus; 7) Infecção sistêmica (Jalo).

O vírus VMFS-EUA purificado foi inoculado mecanicamente nas folhas primárias, mediante a aplicação de carborundo e uma mistura composta pelo vírus purificado (10 µg/mL), tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0 e sulfito de sódio 20 mM. Vinte e quatro horas após o surgimento das primeiras lesões necróticas no cultivar Moruna nc, foi realizada a inoculação de desafio da segunda folha trifoliolada, também na concentração de 10 µg/mL. Nos tratamentos controle, a inoculação das folhas foi realizada somente com tampão fosfato e sulfito de sódio. Quatro dias após a inoculação de desafio foi efetuada a determinação do número de lesões/cm<sup>2</sup> de folha, mediante a amostragem aleatória de três porções de 1 cm<sup>2</sup> de cada folha ou folíolo. Neste mesmo momento, as folhas primária e segunda folha trifoliolada foram coletadas para as avaliações bioquímicas, tais como conteúdo de malondialdeído e atividades enzimáticas. Para as plantas que permitiam a invasão sistêmica, ou seja, a replicação viral em toda a planta (cultivar Jalo), foram realizadas amostragens na folha primária (inoculada) e segunda folha trifoliolada (onde o vírus invadiu sistemicamente). As enzimas que tiveram sua atividade estimada foram catalase, peroxidase e fenilalanina amônia-liase.

No caso das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase, também foram realizadas dosagens de suas atividades no decorrer de 144 horas após a inoculação de indução com o vírus VMFS-EUA, em intervalos de 24 horas.

#### **3.3.1.1. Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA)**

O nível de peroxidação de lipídeos no tecido foliar foi estimado através do conteúdo de MDA presente nas folhas, segundo metodologia descrita por Dhindsa *et al.* (1981). Amostras

de 0,25 g de tecido foliar foram homogeneizadas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (v/v). Este material foi centrifugado a 10000 g durante 5 minutos. Recuperou-se 1 mL do sobrenadante coletado, ao que foram adicionados 4 mL de TCA 20% (v/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA). A mistura foi aquecida em banho-maria a 95°C durante 30 minutos, e então foi rapidamente resfriada em banho de gelo. Após nova centrifugação a 10000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e a absorbância foi determinada a 532 e 600 nm. Subtraiu-se os valores da  $Abs_{512}$  e  $Abs_{600}$ , para eliminar o fator de interferência de pigmentos. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar 155 mM/cm.

#### **3.3.1.2. Atividade da enzima catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)**

A atividade da CAT foi estimada segundo método proposto por Lück (1965), mediante o monitoramento da decomposição do peróxido de hidrogênio a 240 nm. O ensaio baseou-se na adição de 40 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 M em uma mistura de reação contendo 3 mL de tampão fosfato-citrato 65 mM, pH 7,0 e 50 µL do extrato enzimático. As leituras da densidade óptica foram realizadas a cada 30 segundos, durante dois minutos. Para o cálculo da atividade da enzima foram realizados os procedimentos descritos por Vega (1991). A atividade da CAT foi expressa em unidades de catalase (U.C.)/g massa fresca.min.

#### **3.3.1.3. Atividade da enzima peroxidase (PER) (EC 1.11.1.7)**

Os ensaios para a determinação da atividade da enzima PER foram realizados segundo metodologia apresentada por Peyrano *et al.* (1997). Para tanto, 50 µL do extrato vegetal foram adicionados à 3 mL da mistura de reação contendo 1,2 mM de guaiacol, tampão fosfato de

sódio 50 mM, pH 5,7. A reação foi iniciada mediante a adição de 18,5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 M. A reação foi monitorada a 470 nm, e as leituras da absorbância foram realizadas a cada 10 segundos, durante um minuto e trinta segundos. A declividade da curva obtida forneceu uma estimativa da atividade da PER, que foi expressa em variação da Abs<sub>470</sub>/min.g massa fresca.

#### **3.3.1.4. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) (EC 4.3.1.5)**

A determinação da atividade da PAL foi realizada conforme método descrito por Corrizosa & Espitia (1982), com modificações. O material vegetal foi macerado em tampão borato 0,1 M, pH 8,8. Após centrifugação, o sobrenadante coletado foi filtrado em uma coluna Sephadex G-25, utilizando-se o tampão borato 0,1 M, pH 8,0 para a eluição. O meio de reação para a dosagem da atividade da PAL foi constituído de 500 µL do extrato enzimático, 1 mL de L-fenilalanina 12 mM e 1,2 mL de tampão borato 0,1 M, pH 8,8. A leitura da absorbância a 290 nm foi realizada, e o material foi incubado em banho-maria a 40°C durante 90 minutos. Nova leitura foi realizada após este período. Os resultados foram expressos em variação de unidades de absorbância (U.A.)/h.g massa fresca.

#### **3.3.2. Avaliações enzimáticas em experimentos com feijoeiro com nodulação por**

##### ***Rhizobium tropici***

Nos experimentos descritos no item 3.2.5., foram determinados o conteúdo de MDA e a atividade das enzimas CAT, PER e PAL das folhas primárias e segunda folha trifoliolada, segundo os métodos descritos acima.

### **3.3.3. Análise do ácido salicílico endógeno**

As plantas de feijoeiro Moruna nc foram cultivadas conforme descrito anteriormente (item 3.3.1). Quatro dias após a inoculação de desafio, o ácido salicílico total foi extraído de 1 g de folhas, segundo metodologia descrita por Shulaev *et al.* (1995), com algumas modificações. As amostras foram maceradas em 2,5 mL de metanol 90% (v/v), e centrifugadas a 12000 g durante 12 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 2,5 mL de metanol 100% e novamente centrifugado. Os sobrenadantes resultantes destas duas extrações foram combinados e secos em fluxo de N<sub>2</sub> a 40<sup>o</sup>C. Posteriormente, o material foi ressuspensionado em 5 mL de HCl 2 N, a 60<sup>o</sup>C durante 40 minutos. Foi realizada uma extração com 15 mL de acetato de etila, parcelada em três vezes de 5 mL. As amostras foram secas em evaporador rotatório. O extrato foi ressuspensionado em 0,5 mL de tampão para HPLC (23% (v/v) de metanol em tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0) e quantificado por espectrofluorescência, após separação em HPLC com  $\lambda$  excitação de 313 nm e  $\lambda$  emissão de 405 nm (Enyendi *et al.*, 1992). Os extratos foram injetados numa coluna SuperPac Sephacil<sup>TM</sup>C18 5  $\mu$ m (4,0 mm x 25 cm) e as amostras (20  $\mu$ L) foram fracionadas isocriticamente com 23% (v/v) de metanol em acetato de sódio 20 mM, pH 5,0, num fluxo de 1,0 mL/min.

Também foram realizadas quantificações do conteúdo do ácido salicílico no decorrer de 144 horas após a inoculação de indução com o vírus VMFS-EUA, em intervalos de 24 horas.

### **3.3.4. Coleta da seiva do floema e quantificação do ácido salicílico**

As plantas de feijoeiro Moruna nc foram cultivadas conforme descrito no item 3.3.1. Quatro dias após a inoculação de desafio da segunda folha trifoliolada, foi realizada a coleta da

seiva do floema do pecíolo da folha primária (induzida). Para tanto, as folhas foram aspergidas com água destilada, e cobertas com plástico. Em seguida, fez-se um corte em bisel na base dos pecíolos. A parte destacada foi novamente cortada, sob uma solução de tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 6,0 + EDTA 5 mM (Neo & Layzell, 1997). Os pecíolos foram imediatamente mergulhados em um becker contendo 5 mL de uma solução de EDTA 5 mM vedado com plástico, e permaneceram mergulhados nesta solução durante 4 horas. Após este período, foi realizada a determinação do conteúdo de sacarose (Handel, 1968) e nitrato (Cataldo *et al.*, 1975) das amostras coletadas, com o objetivo de confirmar que se tratava da seiva do floema (resultados apresentados no apêndice 3).

As amostras da seiva do floema tiveram seu volume reduzido para 1 mL através de fluxo de N<sub>2</sub> a 40<sup>o</sup>C, e o ácido salicílico livre presente na seiva do floema foi quantificado por HPLC, conforme metodologia descrita no item 3.3.3. Posteriormente, estas mesmas amostras sofreram hidrólise com HCl 2 N, de acordo com metodologia descrita por Enyedi e colaboradores (1992), obtendo-se assim o ácido salicílico total (livre + conjugado). A diferença entre a quantidade do ácido salicílico total e o mesmo composto livre forneceu uma estimativa do conteúdo de ácido salicílico conjugado presente na seiva do floema.

### **3.3.5. Identificação do ácido salicílico por espectrometria de massa**

O ácido salicílico total obtido do floema de feijoeiro Moruna nc com resistência sistêmica adquirida foi submetido a uma análise de espectrometria de massa, com o objetivo de confirmar que se tratava mesmo do ácido salicílico. Tal avaliação foi realizada pelo Instituto de Química/ UNICAMP, em um espectrômetro de massa Extrel monoquadrupolar. A técnica empregada foi a DIMP/T&R-MIMS (Mendes & Eberlin, 2000).

### **3.4. Influência de reguladores de crescimento aplicados exogenamente, sobre a reação de hipersensibilidade e a resistência adquirida**

#### **3.4.1. Efeito da aplicação de reguladores de crescimento sobre a expressão da resistência adquirida**

Em experimento realizado na câmara de crescimento, as folhas primárias de plantas de feijoeiro Moruna nc foram pinceladas com ácido salicílico 5 mM (Hooft van Huijsduijnen *et al.*, 1986) ou 6-benzilaminopurina(6-BA) 111  $\mu$ M (Vega, 1995), visando substituir a indução pelo vírus. Posteriormente, foi realizada a inoculação de desafio da segunda folha trifoliolada destas plantas. O desafio foi realizado mediante a inoculação do vírus VMFS-EUA purificado (10  $\mu$ g/mL) em intervalos de doze horas, iniciando logo após o tratamento hormonal, até 72 horas após.

A expressão da resistência adquirida foi determinada através da contagem do número de lesões locais necróticas/cm<sup>2</sup> de folha e diâmetro das lesões.

#### **3.4.2. Aplicação de benzotiadiazole e avaliação de seus efeitos sobre a resistência sistêmica adquirida**

As plantas de feijoeiro Moruna nc foram cultivadas em câmara de crescimento, em substrato vermiculita. Quando as mesmas apresentaram a primeira folha trifoliolada completamente expandida, foi realizada a aplicação de benzotiadiazole (BTH), na forma do produto comercial BION. O BION foi aplicado nas raízes (sob a forma de irrigação) ou foi aspergido na parte aérea, nas concentrações de 2,5; 5 ou 10 g/100 L. Como tratamentos controle, foi realizada a aplicação de ácido salicílico 5 mM, indução e desafio com o vírus (10

$\mu\text{g/mL}$ ) e planta sadia. A inoculação de desafio da segunda folha trifoliolada com o vírus VMFS-EUA ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) foi realizada quatro dias após a última aplicação do produto (que foi realizada três vezes com intervalos de dois dias entre as aplicações). Aos quatro dias após a inoculação de desafio, foi determinado o número de lesões necróticas na segunda folha trifoliolada, e posteriormente foram realizadas as avaliações das atividades das enzimas PER e PAL e o conteúdo de ácido salicílico total presente nas folhas primária e segunda folha trifoliolada.

### **3.4.3. Efeito da aplicação de reguladores de crescimento sobre a replicação viral**

Plantas de feijoeiro das variedades Moruna nc e Jalo foram cultivadas em substrato vermiculita e irrigadas três vezes por semana com 100 mL de solução completa de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1938). Tais plantas foram mantidas em câmara de crescimento, com  $120 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$  de PAR, fotoperíodo de 12 horas e temperatura constante de  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

As folhas primárias foram inoculadas mecanicamente com o vírus purificado na concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ . Após tal inoculação, estas mesmas folhas foram pinceladas com citocinina 6-benzilaminopurina (6-BA)  $111 \mu\text{M}$  (Vega, 1995); ácido salicílico 5 mM (Hooft van Huijsduijnen *et al.*, 1986) ou BTH (produto BION) 5g/100 L (determinada experimentalmente). No terceiro dia posterior à esta aplicação, foi realizado o teste de PTA-ELISA (Mowat & Dawson, 1987). Os dados obtidos foram comparados com as plantas controle, que não haviam sido tratadas com os respectivos produtos.

### **3.5. Delineamento experimental e análise estatística**

Os experimentos foram completamente casualizados, e foram realizados geralmente três vezes. Sempre foram conduzidas três plantas por tratamento, e foram consideradas como repetições as duas folhas primárias e os três folíolos da segunda folha trifoliolada de cada planta, perfazendo geralmente pelo menos 18 repetições.

A análise estatística dos dados obtidos nos experimentos constou do cálculo da média e desvio padrão, da análise de variância, e, quando necessário, testes complementares (Tukey, 5% de probabilidade). Foi necessária a transformação dos dados referentes ao número de lesões/cm<sup>2</sup> de folha em raiz quadrada.

Nas figuras apresentadas nos resultados as barras representam o erro padrão observado para cada determinação.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito do número de lesões necróticas na indução da resistência adquirida

Quando o vírus VMFS-EUA foi inoculado na metade da folha primária para a indução, o número de lesões locais necróticas produzidas foi semelhante em plantas crescidas em casa de vegetação e em câmara de crescimento. No entanto, as plantas da câmara de crescimento apresentaram algumas lesões na porção desafiada da folha primária, ao contrário das plantas cultivadas na casa de vegetação (fig. 1), quando a indução foi feita com concentrações maiores de 2,5  $\mu\text{g/mL}$  de vírus.

No caso da inoculação da folha primária inteira, o número de lesões produzidas na indução foi novamente semelhante em casa de vegetação e em câmara de crescimento. Quando a segunda folha trifoliolada foi desafiada, ocorreu maior produção de lesões locais necróticas nas plantas cultivadas em câmara de crescimento a partir da concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$  do vírus purificado, embora o número destas lesões tenha sido consideravelmente inferior aos das plantas controle, indicando que ainda assim ocorreu resistência adquirida, com exceção do tratamento de menor concentração do vírus. Já nas plantas cultivadas na casa de vegetação, a folha desafiada apresentou lesões somente quando a indução foi realizada com concentração de 2,5 ou 1,7  $\mu\text{g/mL}$  (fig. 2).

No sistema de inoculação e desafio de meia-folha primária, observou-se que o número de lesões produzidas decresceu de acordo com a menor concentração do vírus na indução. Na casa de vegetação todos os tratamentos de indução inibiram o aparecimento de lesões no desafio, indicando a ocorrência da resistência adquirida, com exceção do tratamento de indução de menor concentração (1,7  $\mu\text{g/mL}$ ). O mesmo comportamento em relação ao número de lesões necróticas ocorridas na indução foi observado na câmara de crescimento.

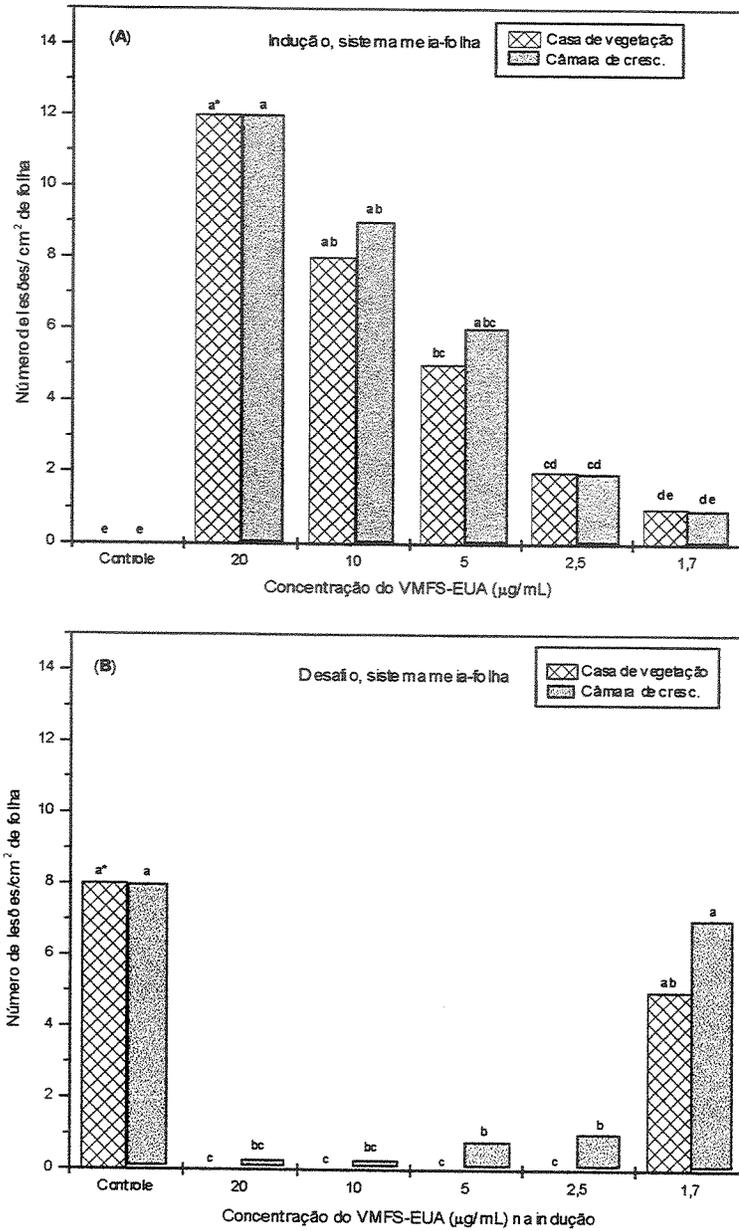


Figura 1. Efeito da concentração viral sobre o número de lesões locais produzidas na indução (A) e no desafio (B) no sistema de inoculação de meia-folha primária em feijoeiro Moruna nc.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

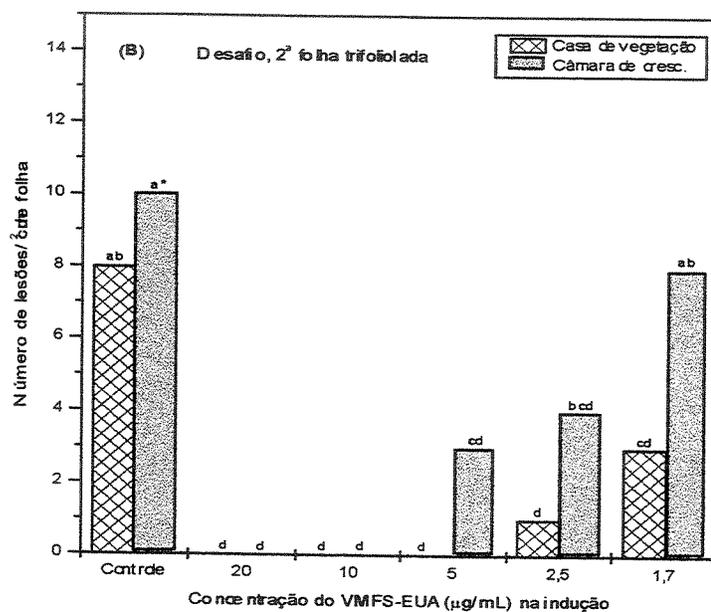
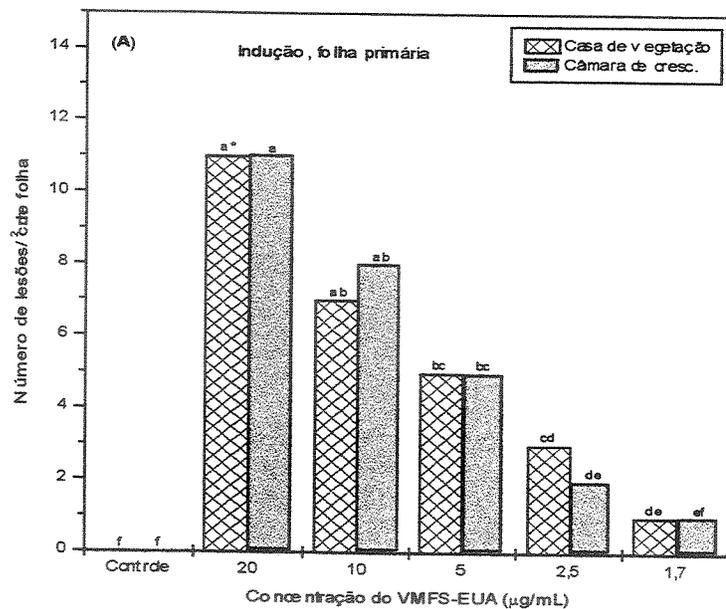


Figura 2. Efeito da concentração viral sobre o número de lesões locais produzidas no sistema de inoculação da folha primária e desafio da segunda folha trifoliolada de feijoeiro Moruna nc, na indução (A) e no desafio (B).

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

No entanto, sob as condições ambientais desta ( $25^{\circ}\text{C}$  constante e  $120\ \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}^1$  de PAR), o número de lesões aumentou na porção desafiada da folha conforme diminuiu o número de lesões na indução. Novamente, na menor concentração viral na indução não foi observada resistência adquirida (fig. 3).

No sistema de indução da folha primária e desafio da segunda folha trifoliolada (sistema sistêmico) também foi observado que à medida que o vírus estava em menor concentração na indução, ocorreu redução no número de lesões locais produzidas. Nas concentrações de  $2,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$  e  $1,7\ \mu\text{g}/\text{mL}$  houve a formação de lesões na folha desafiada, embora em menor número do que nas plantas controle. Neste mesmo sistema, quando as plantas foram cultivadas em câmara de crescimento, ocorreram lesões nas folhas desafiadas já na concentração de  $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ , e em maior quantidade que na casa de vegetação (fig. 4).

#### **4.2. Efeito da radiação luminosa na indução da resistência adquirida**

Quando se modificou experimentalmente a radiação luminosa incidente sobre as plantas de feijoeiro Moruna nc, não foi observado nenhum efeito desta alteração na expressão da resistência adquirida. Tanto em pleno sol, como na câmara de crescimento, ou mesmo sob condições de redução da radiação luminosa incidente, as plantas apresentaram o fenômeno da resistência sistêmica adquirida (fig.5). Entretanto, observou-se maior produção de lesões necróticas na folha desafiada das plantas cultivadas em pleno sol do que nas plantas mantidas na câmara de crescimento.

#### **4.3. Efeito da temperatura na indução da resistência adquirida**

A temperatura foi um fator ambiente determinante para a formação das lesões locais e reação de hipersensibilidade. Plantas submetidas a temperaturas mais elevadas desenvolveram

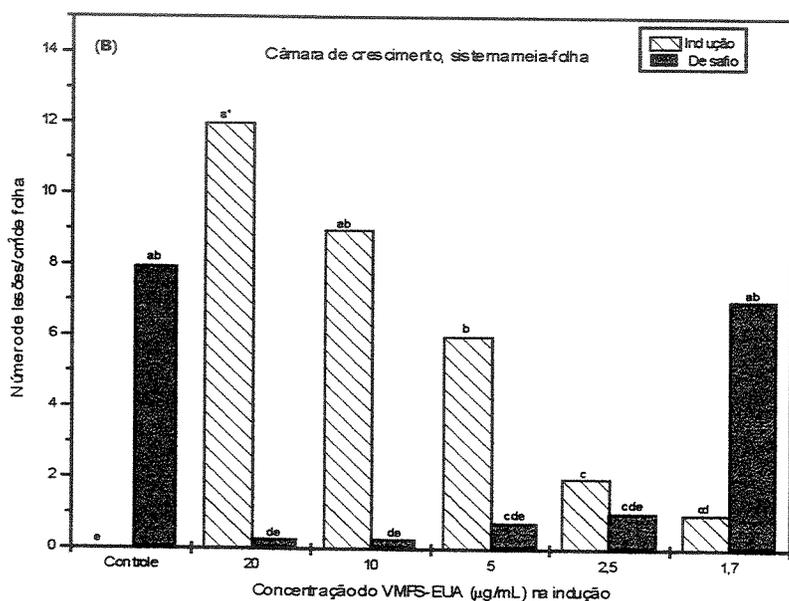
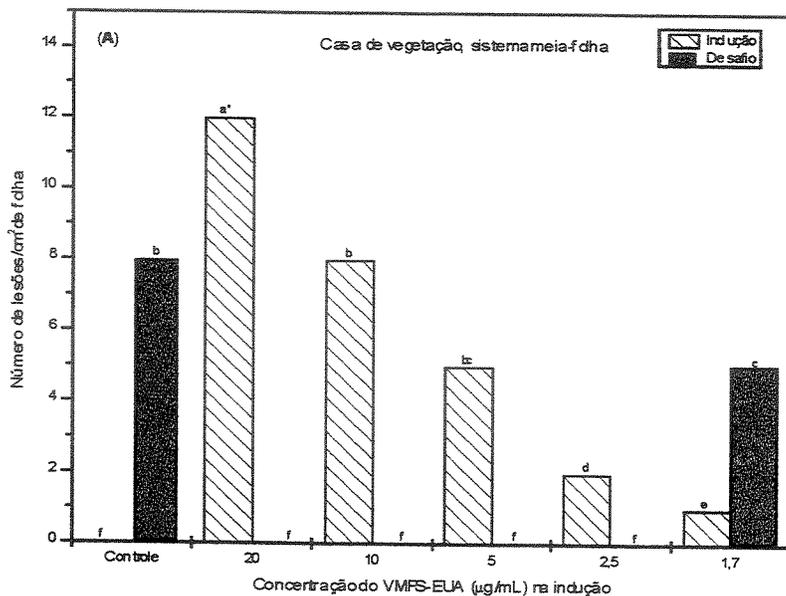


Figura 3. Efeito da concentração viral sobre o número de lesões locais produzidas em casa de vegetação (A) ou câmara de crescimento (B), no sistema meia-folha primária de feijoeiro Moruna nc.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

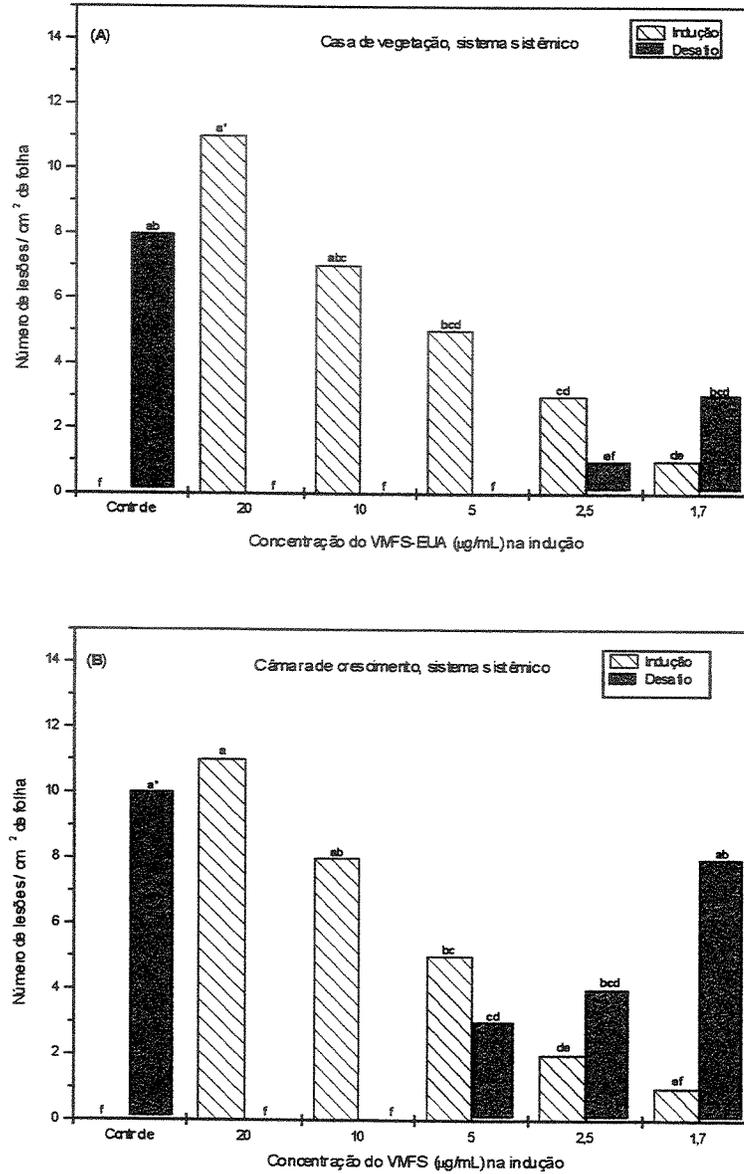


Figura 4. Efeito da concentração viral sobre o número de lesões locais produzidas em casa de vegetação (A) ou câmara de crescimento (B), no sistema de inoculação da folha primária e desafio da segunda folha trifoliolada de feijoeiro Moruna nc.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

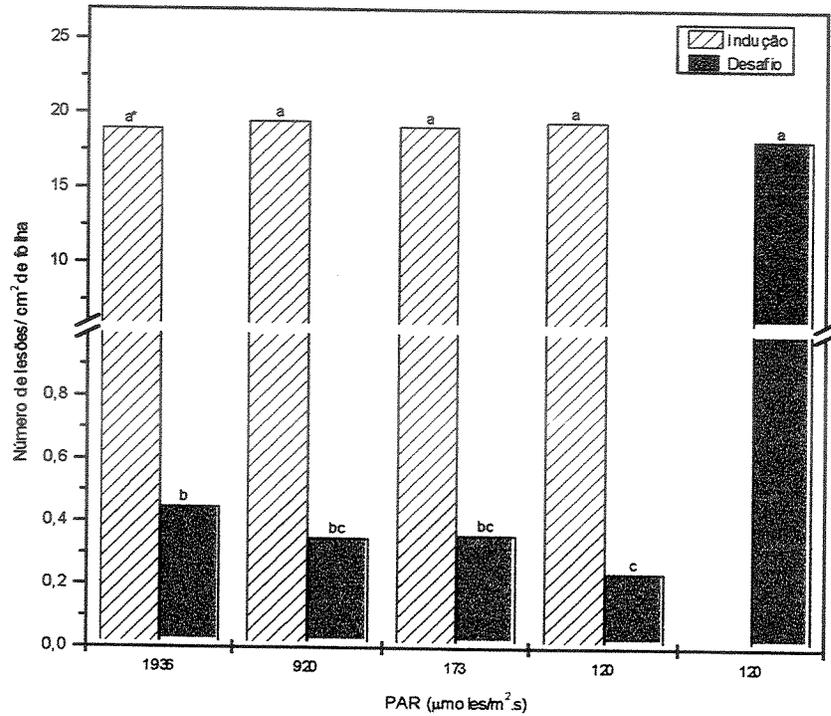


Figura 5. Efeito da radiação luminosa incidente sobre a expressão da resistência sistêmica adquirida em feijoeiro Moruna não inoculado com o vírus VMFS-EUA.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

maior número de lesões necróticas por ocasião da indução, tanto no sistema de inoculação de meia-folha como no sistema sistêmico. Com exceção do tratamento de 20<sup>0</sup>C no sistema meia-folha, todas as plantas expressaram resistência adquirida, evidenciada pelo reduzido número de lesões no desafio. No tratamento de 15<sup>0</sup>C não houve a ocorrência da reação de hipersensibilidade nas plantas inoculadas (fig. 6), e portanto não foi realizada a inoculação de desafio.

Embora as temperaturas mais elevadas tenham possibilitado a formação de maior número de lesões, a temperatura de 20<sup>0</sup>C (no caso, uma das mais baixas aplicadas nestes experimentos) foi a responsável por causar lesões de maior diâmetro (fig. 7). Neste caso, as plantas mantidas sob temperaturas mais elevadas apresentaram maior número de lesões (fig. 6) e de menor tamanho (fig. 7).

Como não foi observada a formação de lesões na temperatura de 15<sup>0</sup>C, as plantas foram transferidas desta temperatura para temperaturas mais elevadas, com o objetivo de verificar se aumentos de temperatura seriam capaz de estimular a ocorrência da reação de hipersensibilidade. Quando as plantas inoculadas a 15<sup>0</sup>C foram transferidas para 25<sup>0</sup>C, ocorreu a formação de lesões, e quando desafiadas a 25<sup>0</sup>C expressaram a resistência sistêmica (tabela 2).

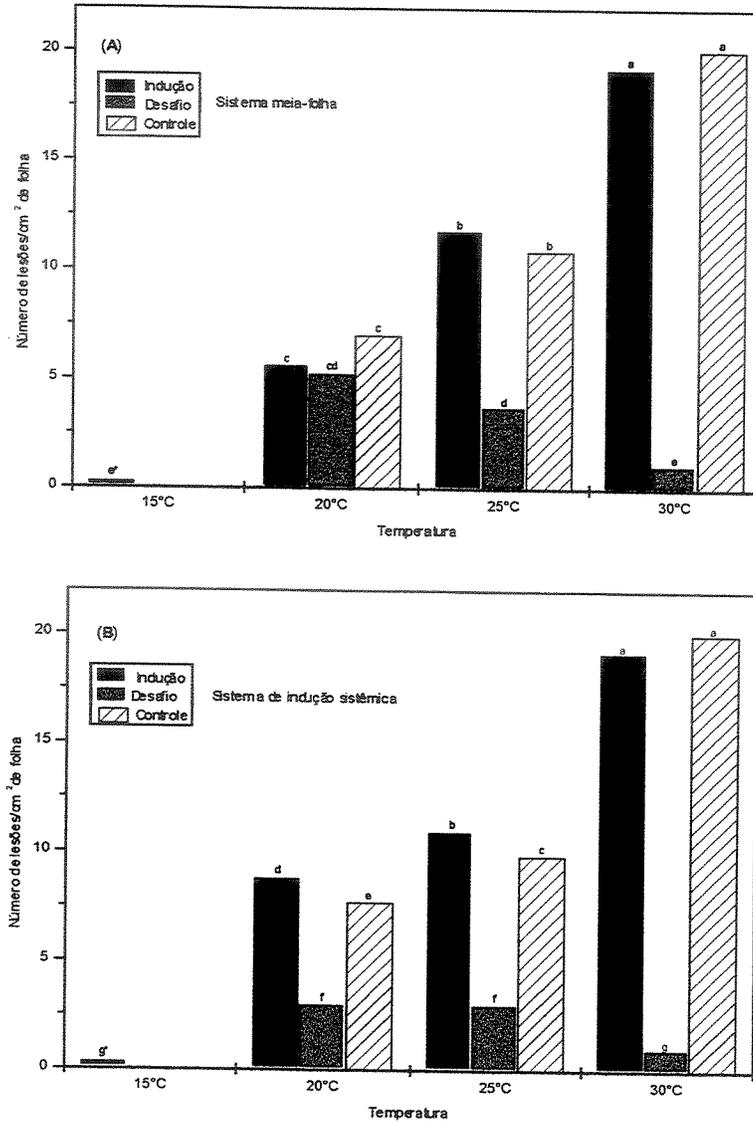


Figura 6. Efeito da temperatura sobre o número de lesões locais produzidas e a expressão da resistência sistêmica adquirida em feijoeiro Moruna nc, no sistema de inoculação de meia-folha primária (A) e inoculação da folha primária e desafio da 2ª folha trifoliolada (B).

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

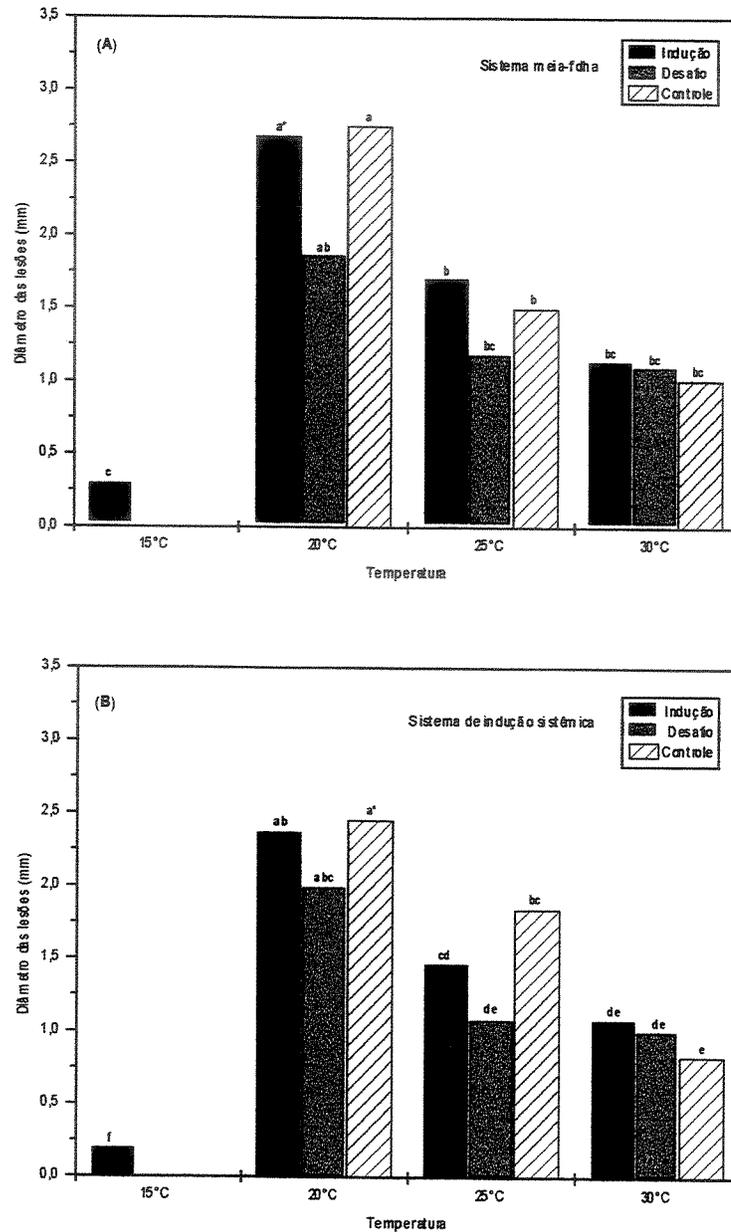


Figura 7. Efeito da temperatura sobre o diâmetro das lesões e a expressão da resistência adquirida em feijoeiro Moruna nc, no sistema de inoculação de meia-folha primária (A) e inoculação da folha primária e desafio da 2ª folha trifoliolada (B).

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Tabela 2. Efeito da temperatura no surgimento das lesões locais necróticas e expressão da resistência adquirida em feijoeiro Moruna nc inoculado com o vírus VMFS-EUA.

Tratamento	Número de lesões/cm <sup>2</sup> de folha	
	Folha primária (indução)	Segunda folha trifoliolada (desafio)
15 <sup>0</sup> C constante	0	0
15 <sup>0</sup> C indução e 25 <sup>0</sup> C (sem desafio)	16*	0
15 <sup>0</sup> C (sem indução) e 25 <sup>0</sup> C desafio	0	17
15 <sup>0</sup> C indução e 25 <sup>0</sup> C desafio	14	05
25 <sup>0</sup> C indução e 25 <sup>0</sup> C desafio	17	03

\* As lesões necróticas surgiram aproximadamente 72 horas após a transferência das plantas da temperatura de 15<sup>0</sup>C para 25<sup>0</sup>C.

Ainda em relação aos efeitos da temperatura sobre as plantas de feijoeiro Moruna nc, as plantas cultivadas sob temperaturas mais altas apresentaram estatura mais elevada, mais massa seca produzida e maior área foliar (fig. 8).

#### 4.4. Duração da expressão da resistência adquirida

No sistema de indução e desafio de meia-folha primária, a resistência adquirida teve duração de até 22 dias após a indução. Já no sistema sistêmico (indução da folha primária e desafio da segunda folha trifoliolada) tal fenômeno durou menos de 22 dias após a indução (tabelas 3 e 4).

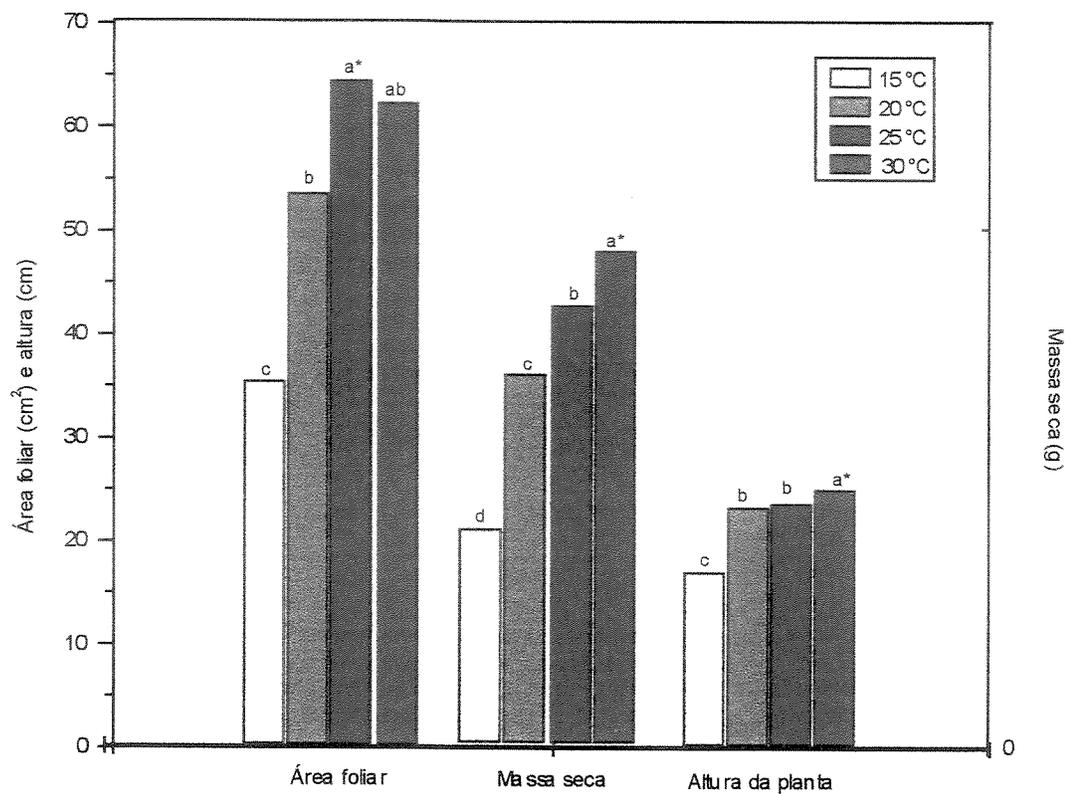


Figura 8. Efeito da temperatura sobre a área foliar, produção de massa seca da folha primária e altura das plantas de feijoeiro Moruna nc.

\* Para cada parâmetro, médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Tabela 3. Duração da expressão da resistência adquirida no sistema meia-folha de feijoeiro Moruna nc inoculado com o vírus VMFS-EUA.

Tratamento	Número de lesões/cm <sup>2</sup> de folha	
	Indução	Desafio
1) Desafio aos 4 dias após a indução	16 Aa*	1,6 Bb
Controle do tratamento 1)	-	16 a
2) Desafio aos 5 dias após a indução	16,7 Aa	0 Bb
3) Desafio aos 6 dias após a indução	17,1 Aa	0 Bb
4) Desafio aos 7 dias após a indução	16,8 Aa	0,9 Bb
Controle do tratamento 4)	-	16,3 a
5) Desafio aos 8 dias após a indução	17,8 Aa	0 Bb
6) Desafio aos 13 dias após a indução	18 Aa	0 Bb
Controle do tratamento 6)	-	12 a
7) Desafio aos 22 dias após a indução	17,9 Aa	0,3 Bb
Controle do tratamento 7)	-	16,3 a

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, comparação na linha; e letra minúscula, comparação na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Tabela 4. Duração da expressão da resistência adquirida no sistema de indução sistêmica, em feijoeiro Moruna nc inoculado com o vírus VMFS-EUA.

Tratamento	Número de lesões/cm <sup>2</sup> de folha	
	Indução	Desafio
1) Desafio aos 4 dias após a indução	14 Aa*	1 Bb
Controle do tratamento 1)	-	12 a
2) Desafio aos 5 dias após a indução	13 Aa	0 Bb
3) Desafio aos 6 dias após a indução	13 Aa	0 Bb
4) Desafio aos 7 dias após a indução	15 Aa	0 Bb
Controle do tratamento 4)	-	13 a
5) Desafio aos 8 dias após a indução	14 Aa	0 Bb
6) Desafio aos 13 dias após a indução	15 Aa	0 Bb
Controle do tratamento 6)	-	14 a
7) Desafio aos 22 dias após a indução	14 Aa	9 Aa
Controle do tratamento 7)	-	13 a

\* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, comparação na linha; e letra minúscula, comparação na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

#### 4.5. Efeito da nodulação sobre a resistência adquirida

A nodulação por *Rhizobium tropici* nas plantas de feijoeiro Moruna nc não afetou a expressão da resistência adquirida no modelo estudado, pois as plantas noduladas e as não noduladas apresentaram valores semelhantes no número de lesões necróticas, tanto na indução como no desafio (tabela 5).

Tabela 5. Efeito da nodulação por *Rhizobium tropici* sobre a ocorrência da resistência sistêmica adquirida em feijoeiro Moruna nc inoculado com o vírus VMFS-EUA.

Tratamento	Inoculação com VMFS-EUA		Número de lesões/cm <sup>2</sup> de folha		Número de nódulos/planta	Massa fresca dos nódulos (g)
	Indução	Desafio	Folha primária	2ª folha trifoliolada		
Controle, não nodulada	-	-	-	-	0	-
Controle, nodulada	-	-	-	-	256	1,69
Não nodulada	-	+	-	16	0	-
Não nodulada	+	-	16	-	0	-
Não nodulada	+	+	16	01	0	-
Nodulada	-	+	-	15	266	1,67
Nodulada	+	-	16	-	234	1,40
Nodulada	+	+	16	01	245	1,70

#### 4.6. Determinações bioquímicas

O conteúdo de MDA foi mais elevado somente nos tratamentos que envolveram a formação de lesões necróticas (fig. 9). A enzima CAT apresentou maiores valores de atividade nas folhas primárias quando comparadas com a segunda folha trifoliolada em todos os tratamentos. No entanto, esta enzima apresentou valores de atividade ainda maiores no tratamento em que ocorreu o processo de infecção sistêmica, não apresentando maiores variações de atividade nos demais tratamentos (fig. 10). Por sua vez, a enzima PER também apresentou maior atividade nas folhas que receberam a inoculação do vírus, ou seja, que estavam apresentando a reação de hipersensibilidade, mas também teve sua atividade aumentada nas folhas que estavam expressando resistência (fig. 11). De uma forma

semelhante à enzima peroxidase, as folhas inoculadas e as com resistência adquirida apresentaram maiores valores na atividade da enzima PAL (fig. 12).

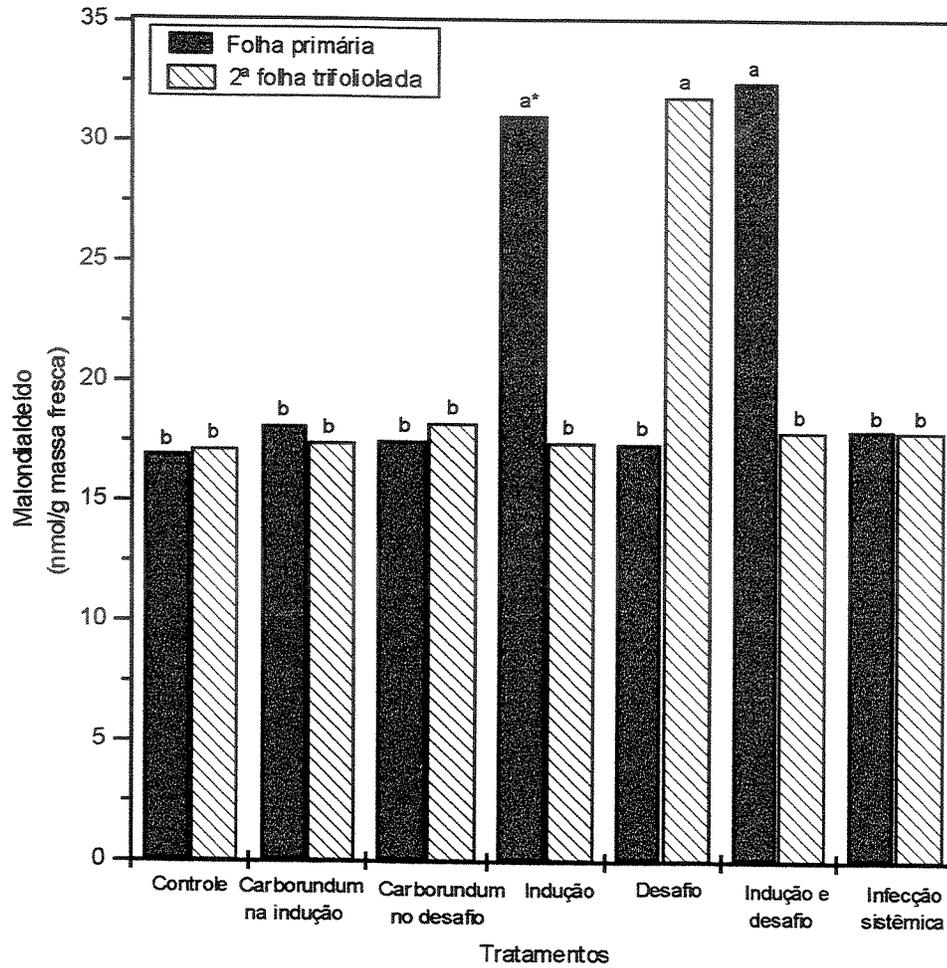


Figura 9. Conteúdo de MDA em plantas de feijoeiro Moruna nc (reação de hipersensibilidade) e Jalo (infecção sistêmica) inoculadas com o VMFS-EUA.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

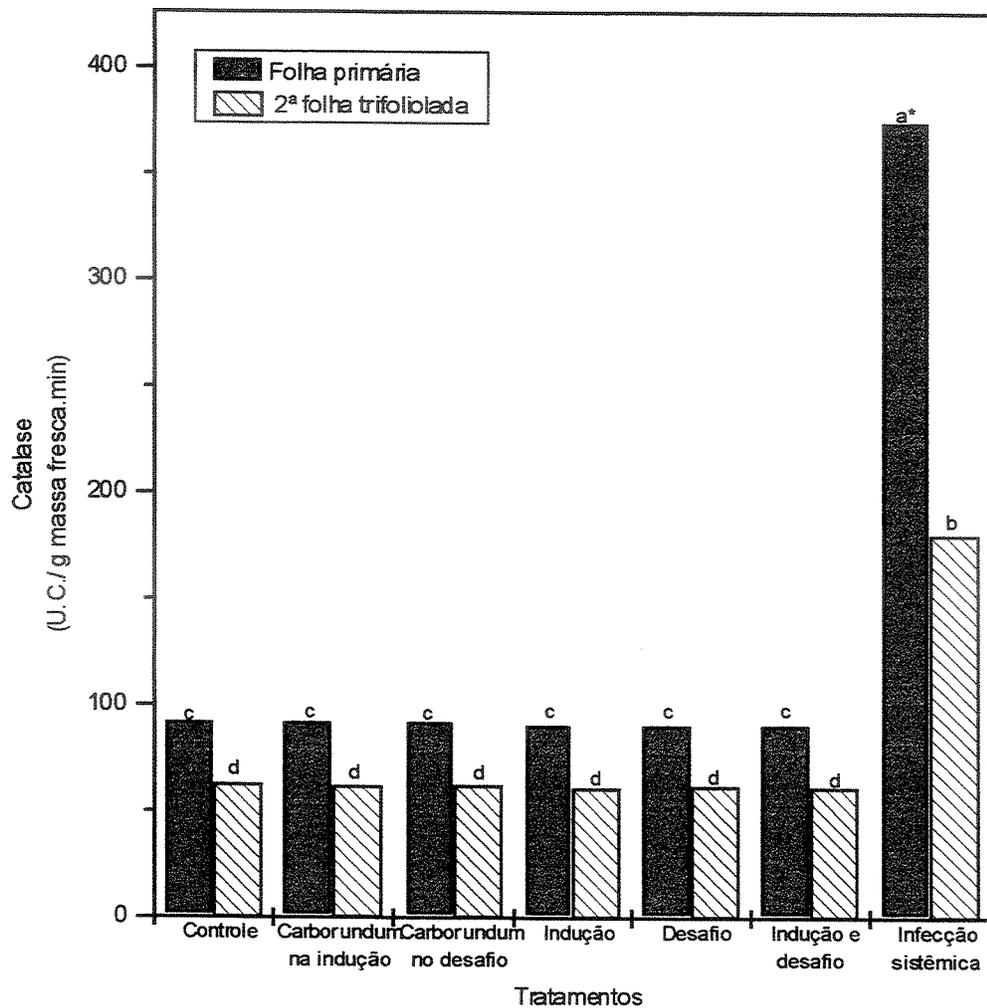


Figura 10. Atividade da enzima catalase em plantas de feijoeiro Moruna nc (reação de hipersensibilidade) e Jalo (infecção sistêmica) inoculadas com o VMFS-EUA.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

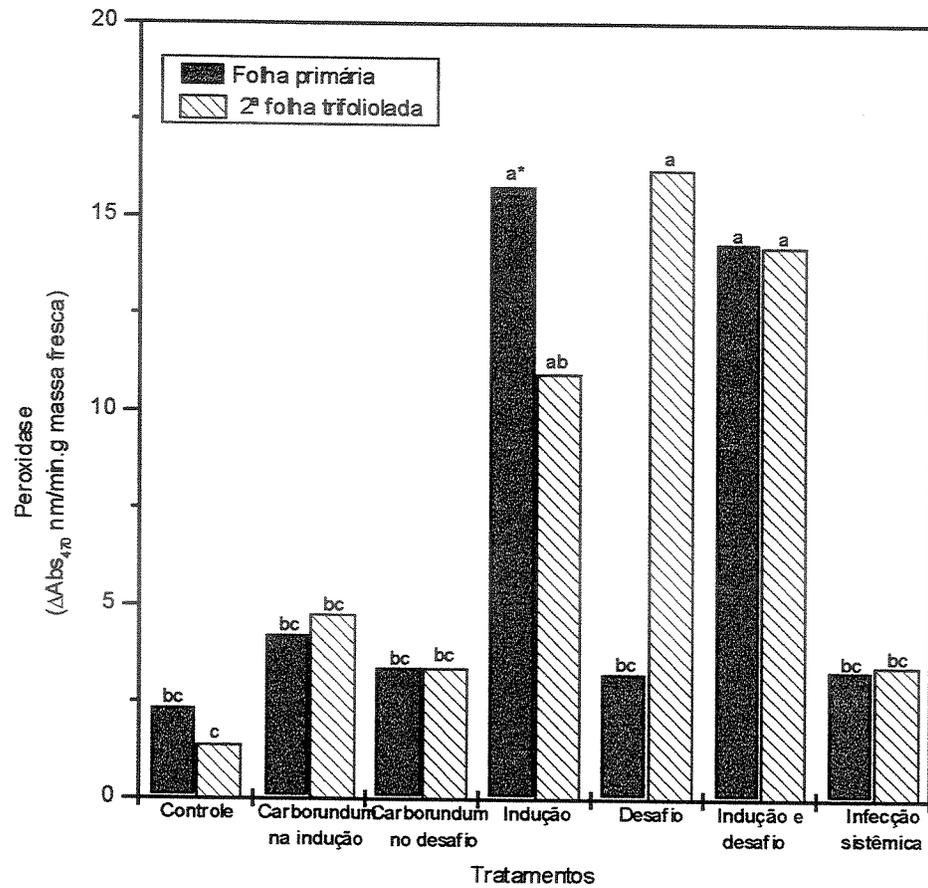


Figura 11. Atividade da enzima peroxidase em plantas de feijoeiro Moruna na reação de hipersensibilidade e Jalo (infecção sistêmica) inoculadas com o VMFS-EUA.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

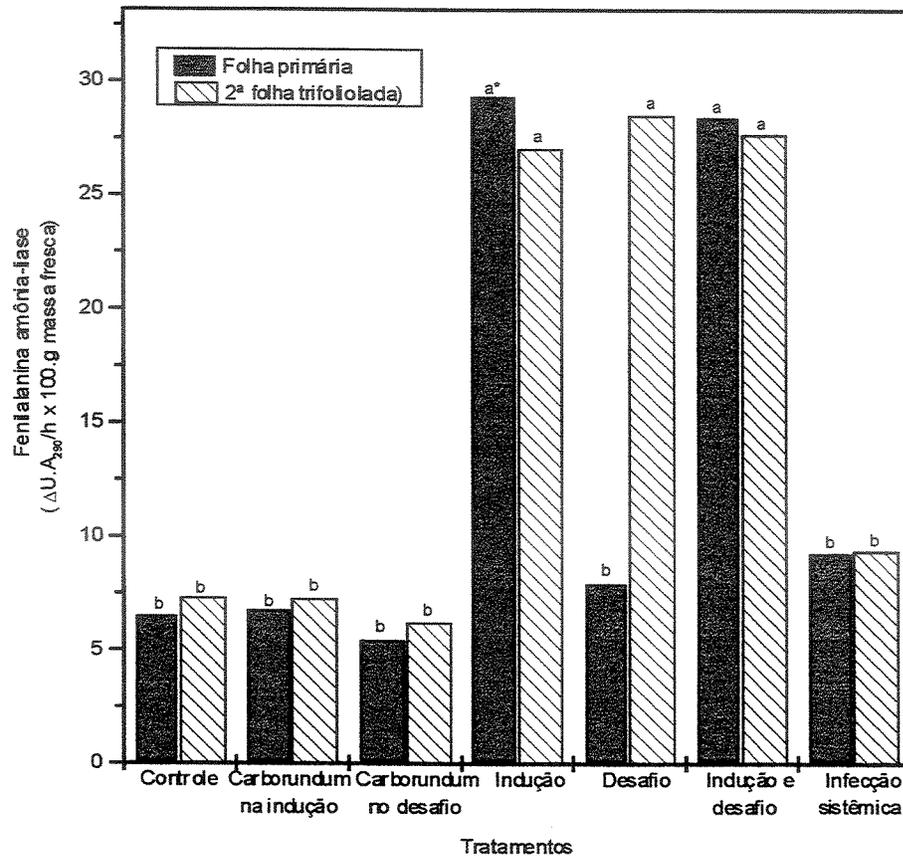


Figura 12. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro Moroneja (reação de hipersensibilidade) e Jalo (infecção sistêmica) inoculadas com o VMFS-EUA.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Não foram observadas diferenças em relação à peroxidação de lipídeos entre as plantas noduladas e as não-noduladas. Novamente, o aumento no conteúdo de MDA esteve associado à necrose celular (fig. 13). A enzima CAT apresentou maiores valores de atividade na segunda folha trifoliolada nos tratamentos de indução, desafio e indução + desafio nas plantas não noduladas. Mas, de um modo geral, ocorreu pouca variação na sua atividade nos tratamentos aplicados (fig. 14). A nodulação não afetou a atividade das enzimas peroxidase e PAL, cujos valores de atividade foram superiores nos tratamentos em que as plantas expressaram a resistência sistêmica, ou quando ocorreu a formação de lesões (fig. 15 e 16).

#### **4.7. Cronologia das alterações nas atividades enzimáticas**

A enzima peroxidase teve sua atividade aumentada somente nas folhas primárias inoculadas, e a partir de 48 horas após a indução. Na segunda folha trifoliolada foi observada maior atividade da peroxidase somente no tratamento de indução e desafio, 120 horas após a indução (fig. 17). Já a PAL apresentou aumento na atividade a partir de 24 horas após a indução, atingindo o máximo de atividade 120 horas após esta inoculação. Diferentemente da peroxidase, todos os tratamentos aplicados (com exceção do controle) ocasionaram aumento na atividade da PAL (fig. 18).

#### **4.8. Determinação do ácido salicílico endógeno**

A análise de espectrometria de massa identificou ácido salicílico na seiva do floema de pecíolos das folhas primárias induzidas (fig. 19).

Em folhas que estavam expressando a resistência sistêmica adquirida induzida pela inoculação do vírus nas folhas primárias, foi verificado aumento de até 50 vezes no conteúdo do ácido salicílico total. O aumento do teor de ácido salicílico na segunda folha trifoliolada

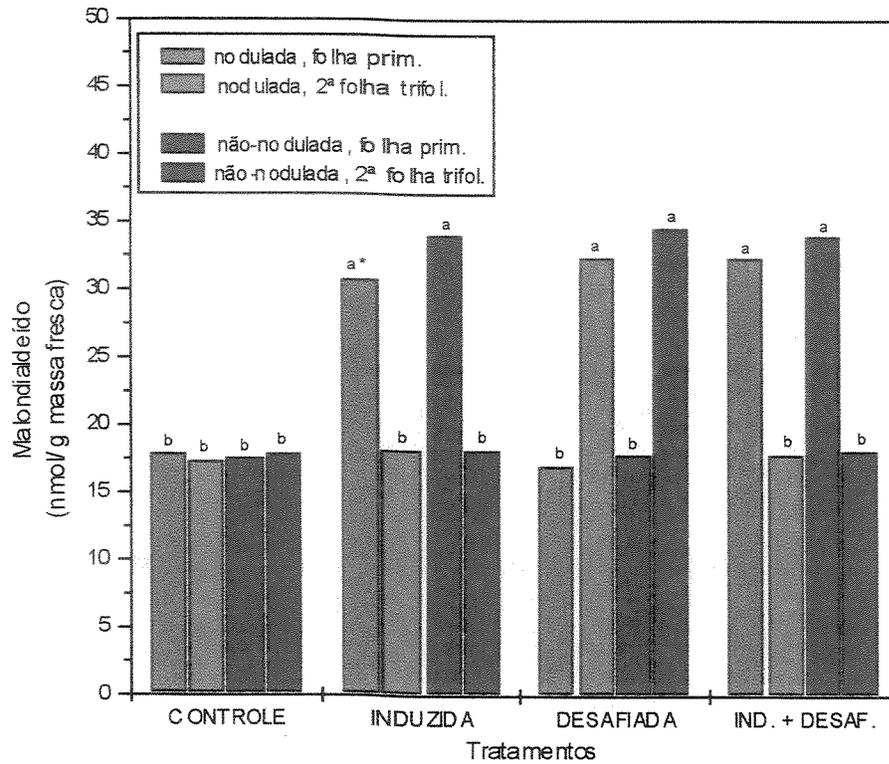


Figura 13. Efeito da nodulação sobre o conteúdo de MDA em plantas de feijoeiro Moruna nc expressando resistência sistêmica adquirida.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

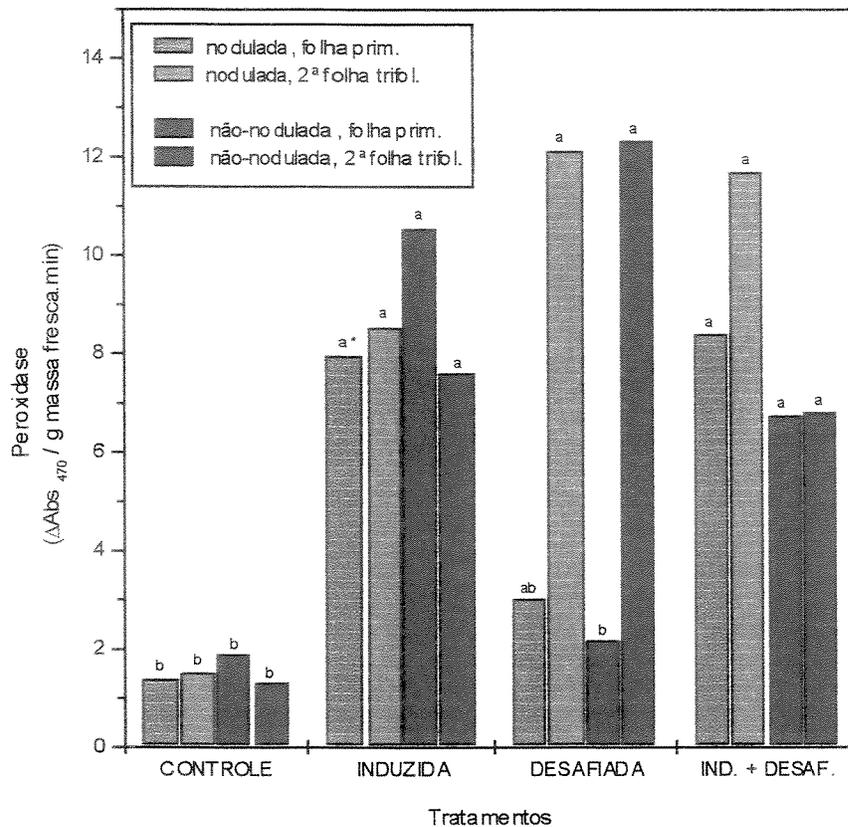


Figura 15. Efeito da nodulação sobre a atividade da enzima peroxidase em plantas de feijoeiro Moruna nc expressando resistência sistêmica adquirida.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

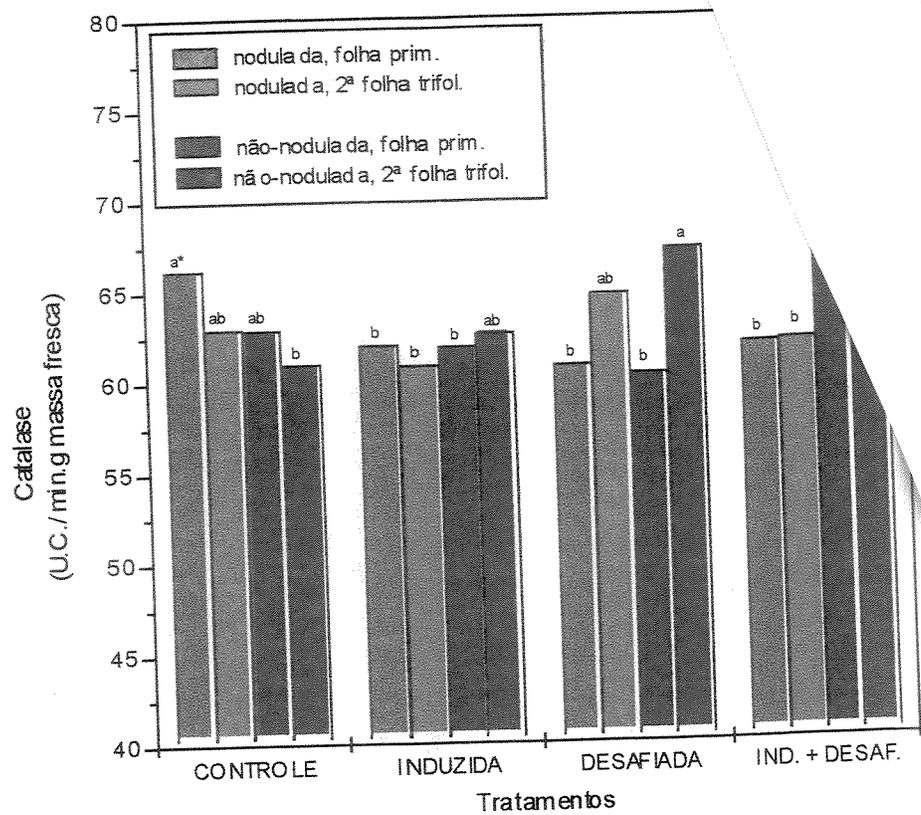


Figura 14. Efeito da nodulação sobre a atividade da enzima catalase em plantas de feijoeiro Moruna não expressando resistência sistêmica adquirida.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

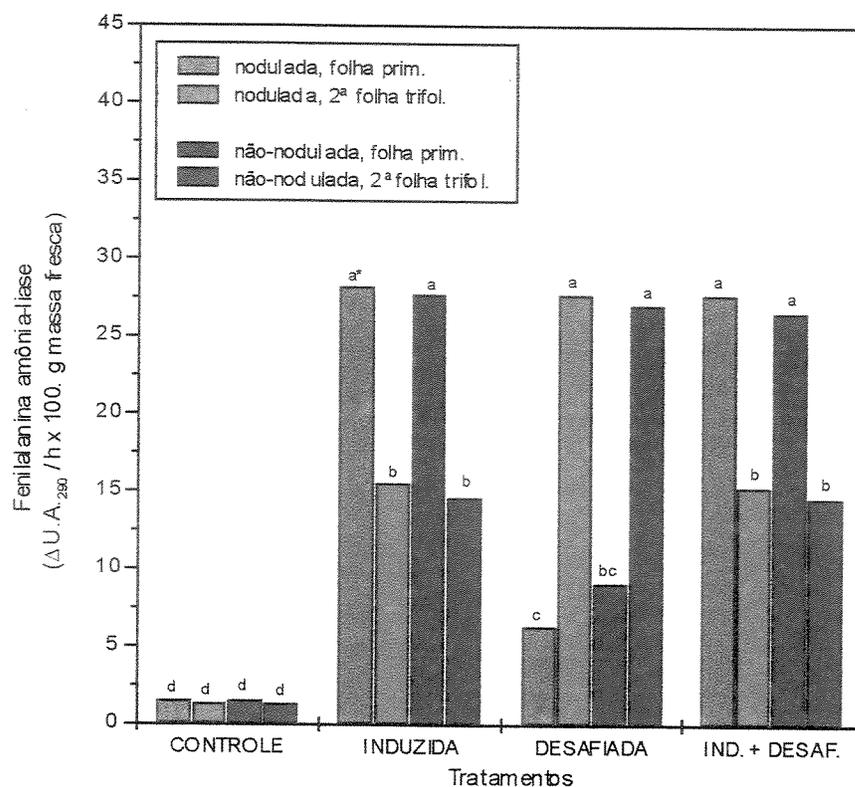


Figura 16. Efeito da nodulação sobre a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro Moronecensisc expressando resistência sistêmica adquirida.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

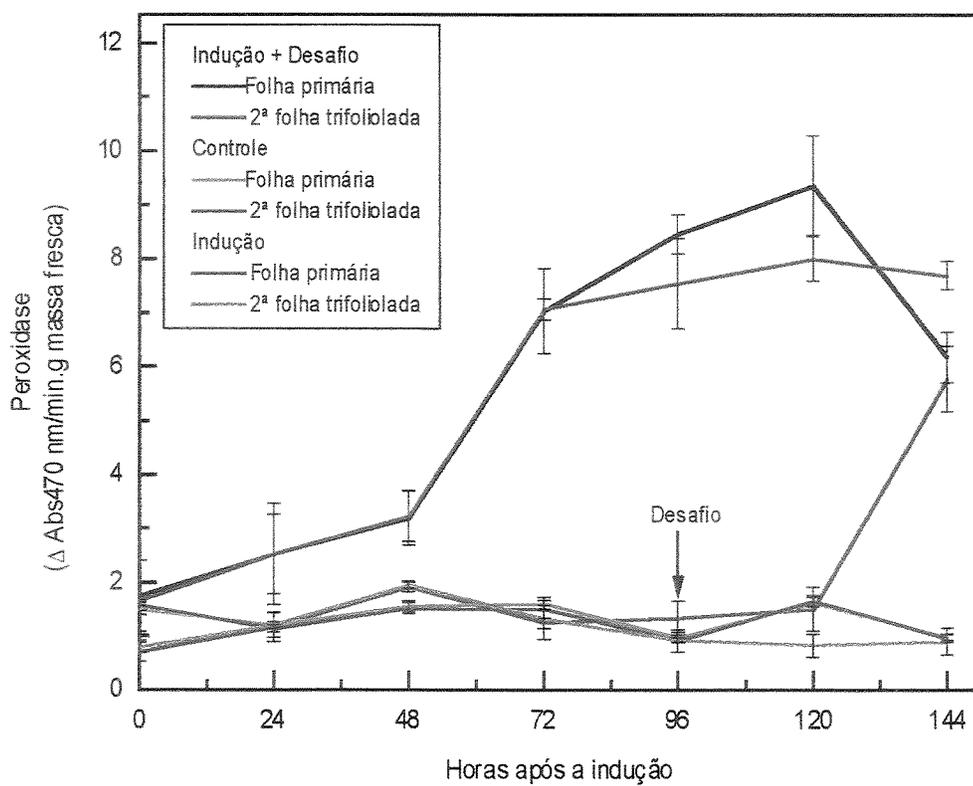


Figura 17. Atividade da enzima peroxidase em plantas de feijoeiro Moruna nc, no decorrer de 144 horas após a inoculação de indução (folha primária) com o vírus VMFS-EUA.

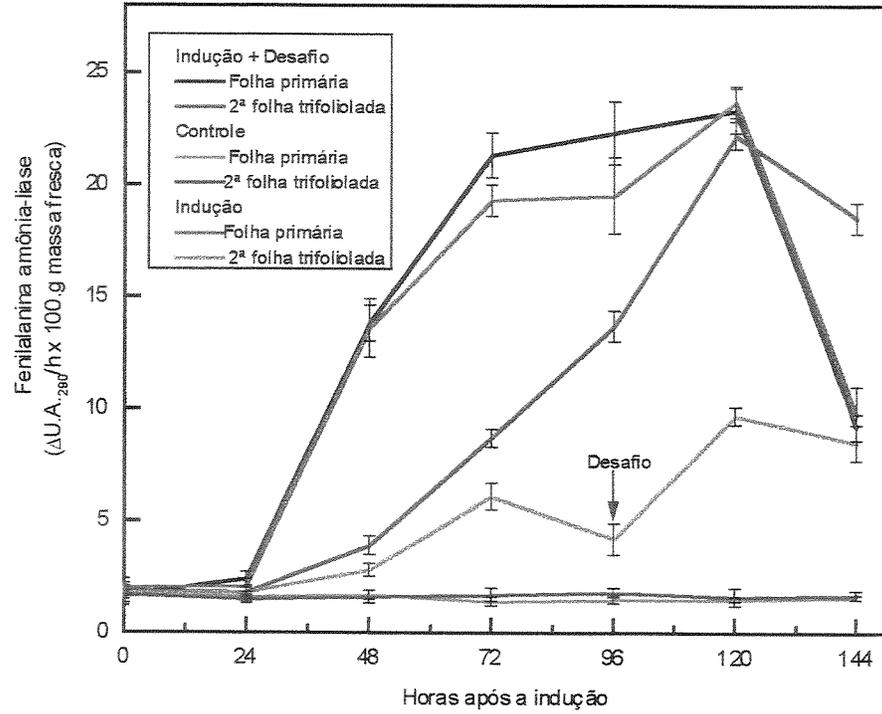


Figura 18. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro *Moronecense*, no decorrer de 144 horas após a inoculação de indução (folha primária) com o vírus VMFS-EUA.

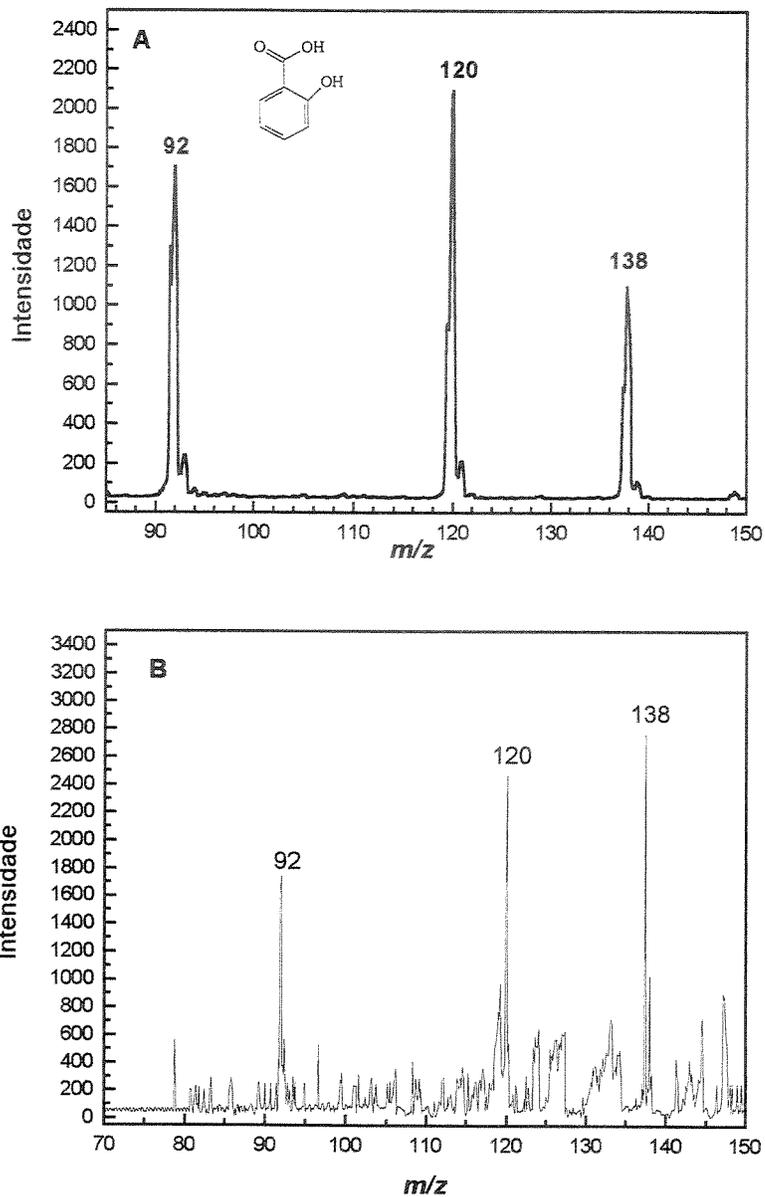


Figura 19. Identificação por espectrometria de massa do ácido salicílico total presente na seiva do floema de feijoeiro Moruna nc, durante a expressão da resistência sistêmica adquirida. (A) padrão; (B) ácido salicílico extraído da seiva do floema.

também foi observado nos tratamentos em que não foi efetuada uma inoculação direta (tratamentos de somente indução e somente desafio) (fig. 20).

Nos experimentos onde foi examinada a evolução do conteúdo do ácido salicílico em função do tempo, se observou que o aumento deste composto só ocorreu 72 horas após a inoculação, atingindo máximo valor após 120 horas, tanto na folha inoculada como na não inoculada. O desafio na segunda folha trifoliolada fez com que ocorresse uma tendência de aumento até a última dosagem (144 horas) (fig. 21).

Foi observado que o ácido salicílico presente na seiva do floema das plantas resistentes encontrava-se na maior parte sob a forma conjugada (tabela 6).

#### **4.9. Aplicação de reguladores de crescimento**

A aplicação de ácido salicílico via aspersão foliar induziu resistência sistêmica a partir de doze horas após a sua aplicação, evidenciada pela redução de 15 lesões/cm<sup>2</sup> de folha, no controle, para 2 lesões/cm<sup>2</sup> nas folhas tratadas. No entanto, o efeito do ácido salicílico somente foi significativo até o teste realizado 48 horas após a sua aplicação (fig. 22).

Nas plantas que receberam aplicações de 6-BA, não foi observado nenhum efeito deste regulador de crescimento sobre a expressão da resistência sistêmica, pois tanto as folhas tratadas como as controle apresentaram valores semelhantes no número de lesões locais necróticas. Na média, as folhas tratadas com citocinina apresentaram tamanho um pouco maior nas lesões produzidas do que as folhas controle, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (tabela 7).

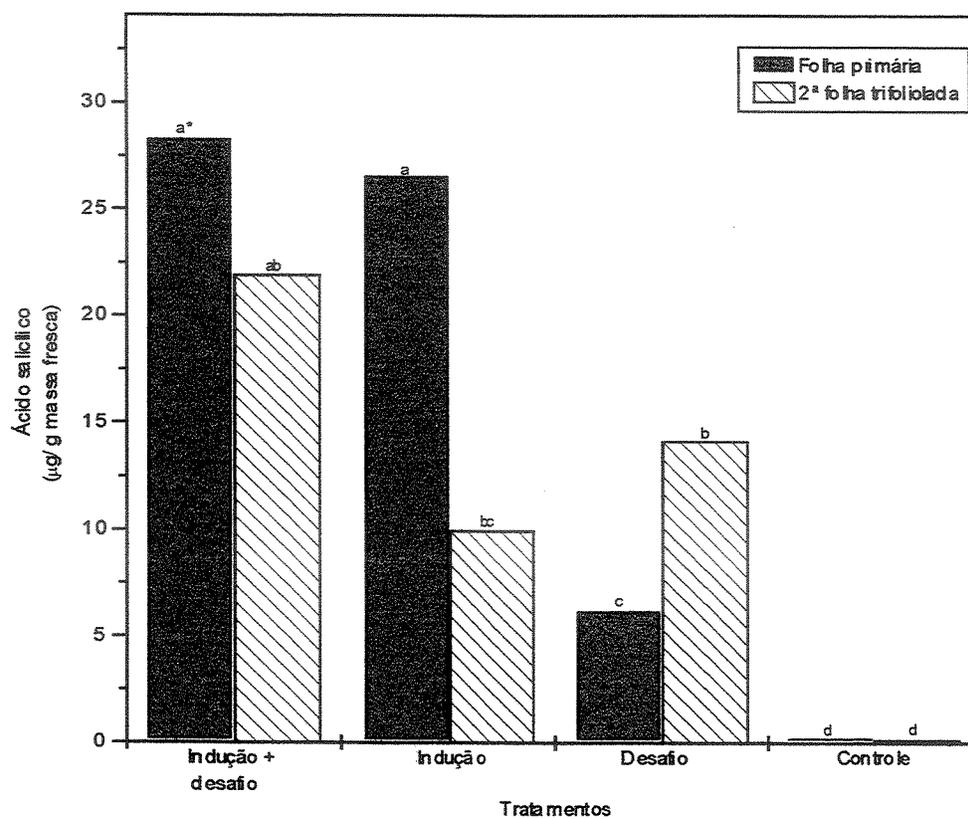


Figura 20. Conteúdo de ácido salicílico total, presente nas folhas de feijoeiro Moruna nc durante a expressão da resistência sistêmica adquirida.

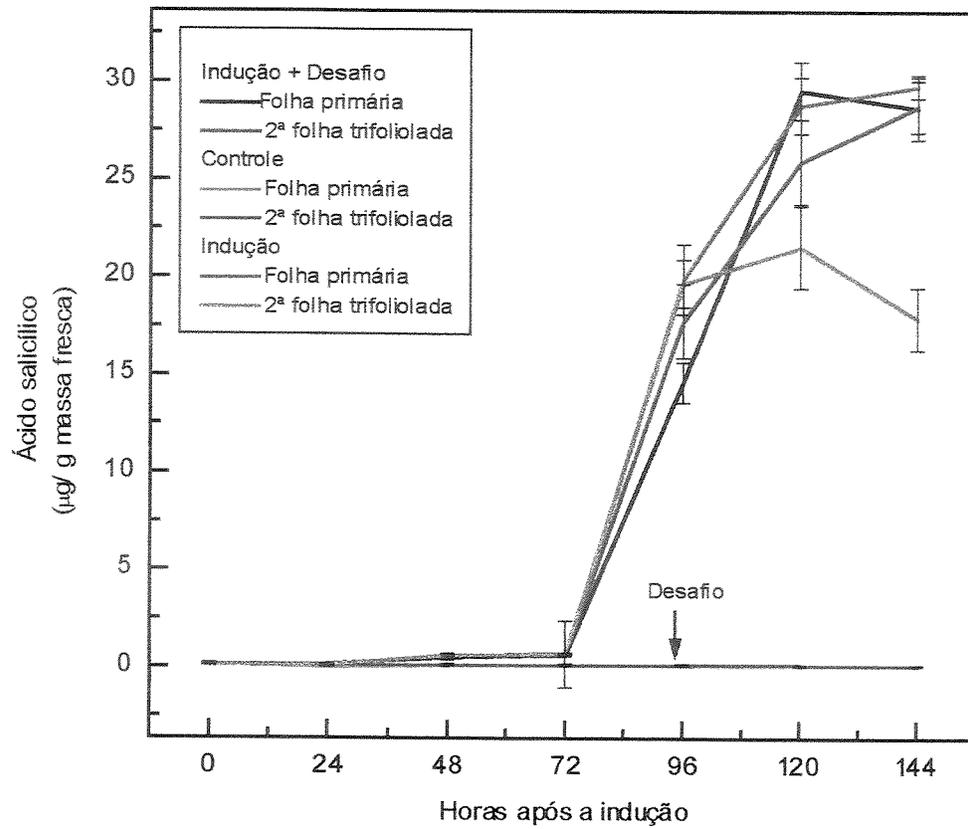


Figura 21. Conteúdo de ácido salicílico total, presente nas folhas de plantas de feijoeiro Moruna nc, no decorrer de 144 horas após a inoculação de indução (folha primária) com o vírus VMFS-EUA.

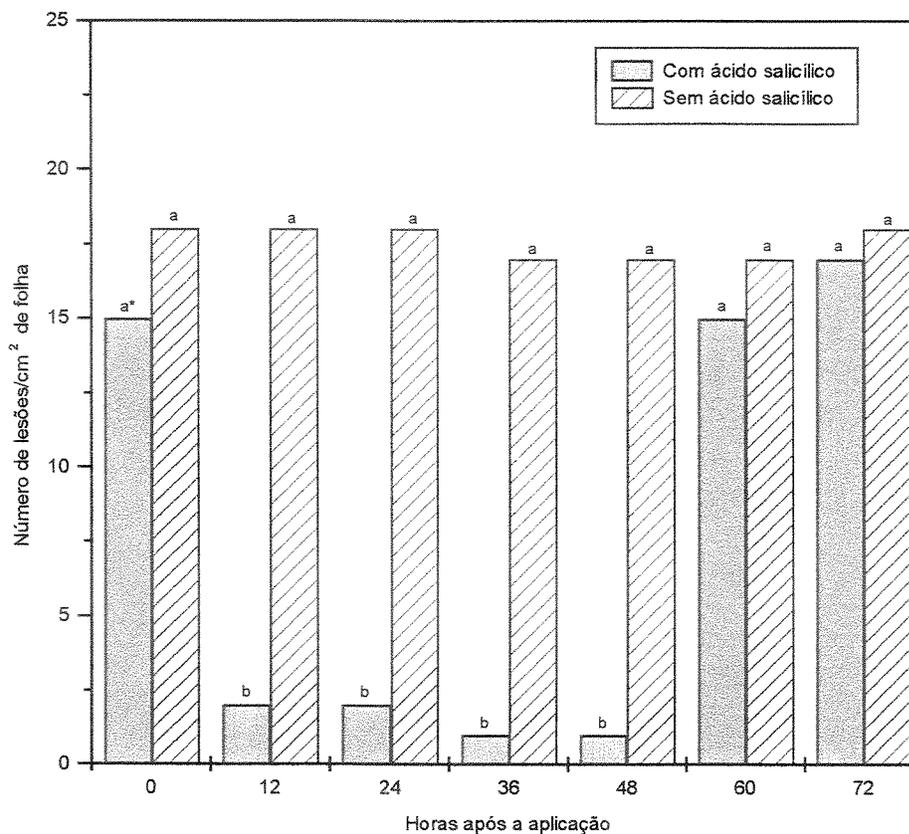


Figura 22. Efeito da aplicação de ácido salicílico na reação de hipersensibilidade da segunda folha trifoliolada de feijoeiro Moruna nc inoculado com o vírus VMFS-EUA.

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Tabela 6. Conteúdo de ácido salicílico livre e conjugado presentes na seiva do floema em pecíolos da folha primária de feijoeiro Moruna nc.

Tratamento	Conteúdo de ácido salicílico ( $\mu\text{g}/\text{folha}$ )	
	Livre	Conjugado
Controle	0,0056	0,0070
Somente indução	0,0090	0,22
Somente desafio	0,0078	0,17
Indução e desafio	0,0102	0,19

Tabela 7. Número de lesões locais necróticas e diâmetro das lesões na segunda folha trifoliolada de plantas de feijoeiro Moruna nc submetidas ao tratamento com 6-benzilaminopurina (6-BA).

Tratamento	Número de lesões/cm <sup>2</sup> de folha	Diâmetro das lesões (mm)
Controle	22 a*	2,0 a
Indução e desafio com o vírus	03 b	0,5 b
0 horas após a aplicação de 6-BA	22 a	2,0 a
12 horas após a aplicação de 6-BA	20 a	1,5 a
24 horas após a aplicação de 6-BA	23 a	2,0 a
36 horas após a aplicação de 6-BA	19 a	2,5 a
48 horas após a aplicação de 6-BA	25 a	2,0 a
60 horas após a aplicação de 6-BA	22 a	2,5 a
72 horas após a aplicação de 6-BA	21 a	2,5 a

\*Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

#### **4.10. Aplicação de indutor de resistência**

Tanto na aplicação do produto BION (BTH) no solo como foliar, o produto induziu resistência nos feijoeiros, nas doses de 2,5 e 5 g/100 L, evidenciada pela considerável redução no número de lesões necróticas nas folhas desafiadas quando comparadas com as plantas controle (fig. 23). A dose de 10 g do produto comercial (BION) /100 L causou sintomas de fitotoxicidade, impossibilitando a inoculação do vírus para o desafio das folhas. A enzima peroxidase teve sua atividade aumentada nas plantas tratadas com o produto (fig. 24), mas a enzima PAL não apresentou tal comportamento (fig. 25). O produto conferiu resistência às plantas durante o período de nove dias (tabela 8), e o conteúdo de ácido salicílico nas folhas das plantas tratadas com BTH foi similar ao das plantas controle (fig. 26).

#### **4.11. Avaliação da concentração de vírus após diversos tratamentos químicos**

O tratamento de aplicação de citocinina permitiu maior replicação viral, monitorada pelo teste PTA-ELISA, tanto no caso de invasão sistêmica (variedade Jalo) como no cultivar hipersensível (Moruna nc). Já as folhas tratadas com ácido salicílico e com BTH mostraram redução na replicação viral, apresentando valores de absorbância em PTA-ELISA praticamente iguais aos da planta sadia (tabela 9).

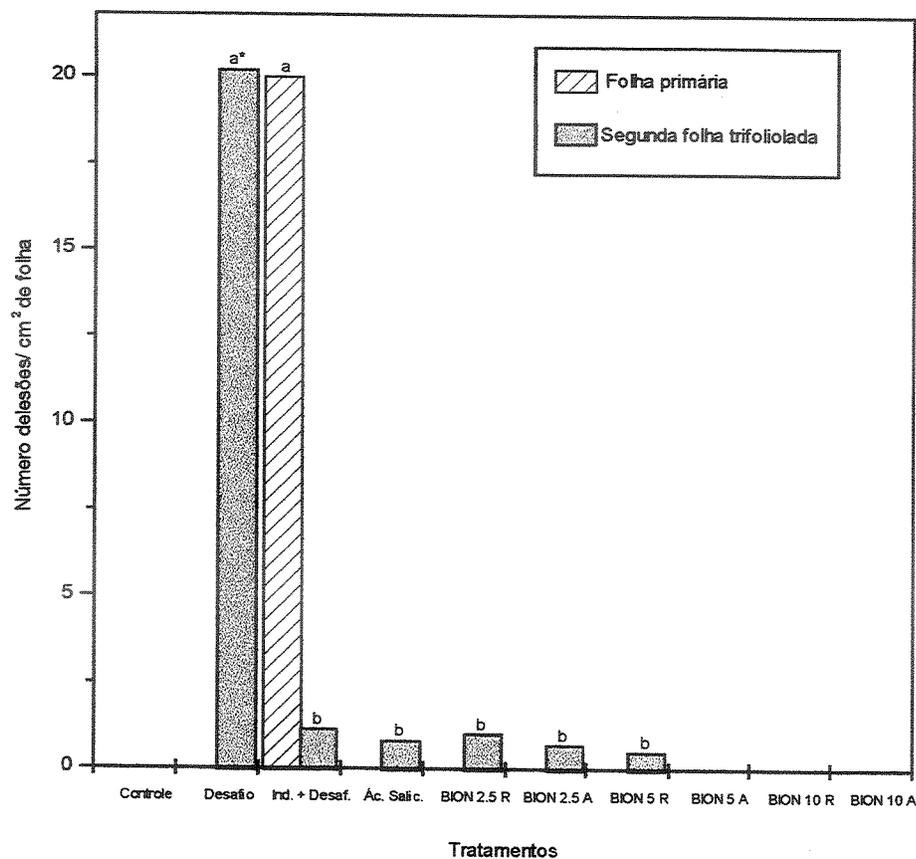


Figura 23. Efeito da aplicação do produto BION (BTH) na indução da resistência adquirida em feijoeiro Moruna nc.

R= Aplicação do produto no solo (raízes); A = aplicação do produto via aspersão na parte aérea.  
 Doses: 2,5 ; 5 e 10 g/100 L

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

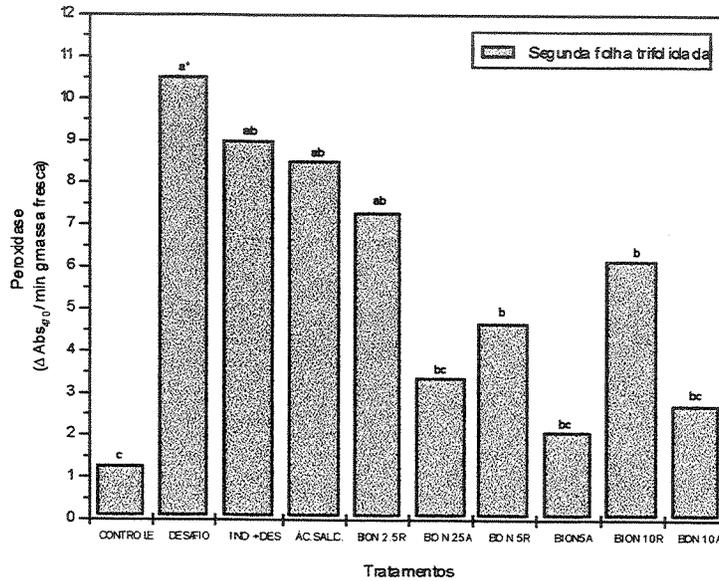
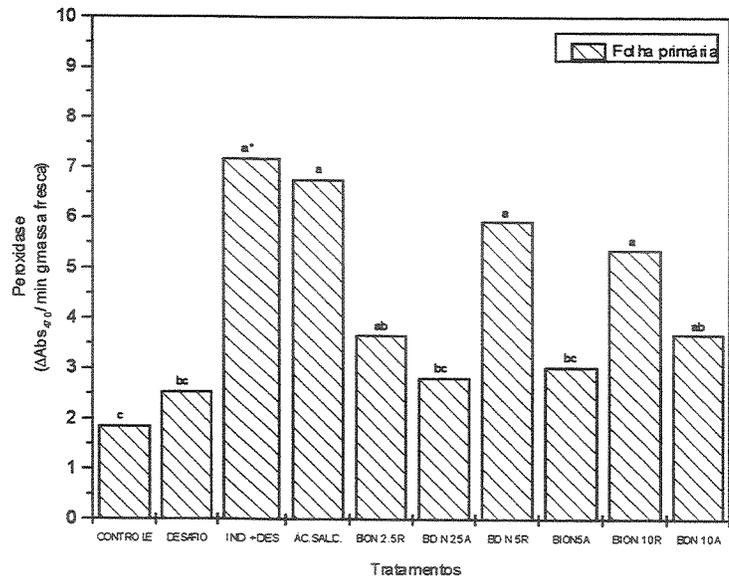


Figura 24. Efeito da aplicação do produto BION (BTH) na atividade da enzima peroxidase em folhas de feijoeiro Moruna nc.

R= Aplicação do produto no solo (raízes); A = aplicação do produto via aspersão na parte aérea.

Doses: 2,5 ; 5 e 10 g/100 L

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

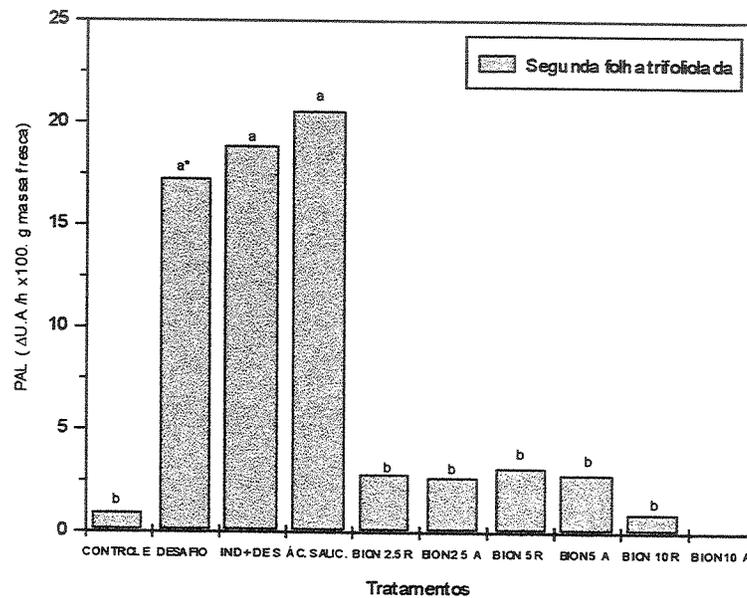
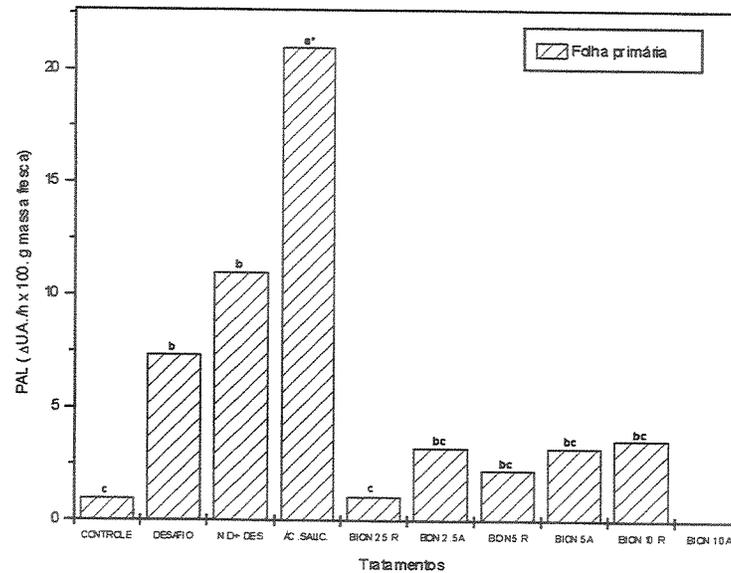


Figura 25. Efeito da aplicação do produto BION (BTH) na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em folhas de feijoeiro Moruna nc.

R= Aplicação do produto no solo (raízes); A = aplicação do produto via aspersão na parte aérea.

Doses: 2,5 ; 5 e 10 g/100 L

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

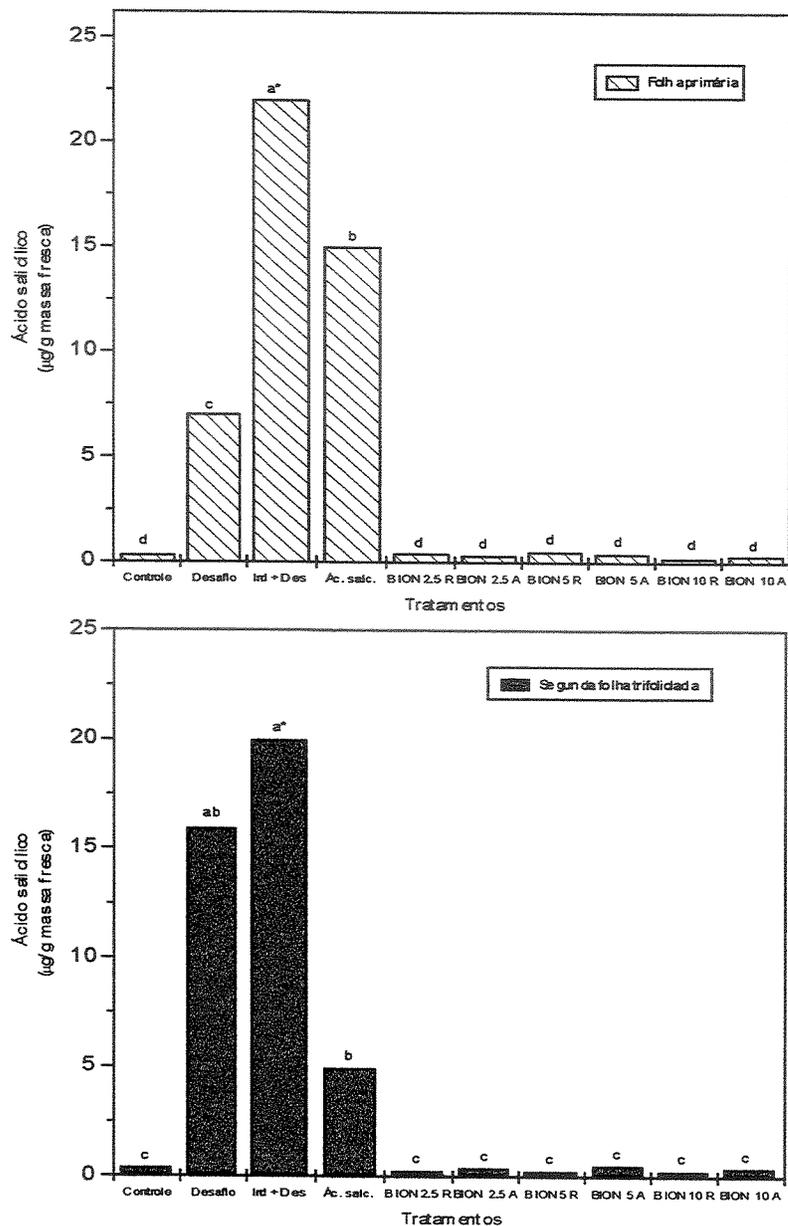


Figura 26. Efeito da aplicação do produto BION (BTH) no conteúdo de ácido salicílico total em folhas de feijoeiro Moruna nc.

R= Aplicação do produto no solo (raízes); A = aplicação do produto via aspersão na parte aérea.

Doses: 2,5 ; 5 e 10 g/100 L

\* Médias assinaladas pela(s) mesma(s) letra(s) não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Tabela 8. Duração do efeito da aplicação de BTH sobre a expressão da resistência adquirida em feijoeiro Moruna nc desafiado com VMFS-EUA.

Tratamento	Número de lesões locais/cm <sup>2</sup> de folha na segunda folha trifoliolada
Controle	21 a*
Desafio 1 dia após a aplicação de BTH	22 a
Desafio 2 dias após a aplicação de BTH	07 b
Desafio 3 dias após a aplicação de BTH	04 b
Desafio 4 dias após a aplicação de BTH	06 b
Desafio 5 dias após a aplicação de BTH	03 b
Desafio 6 dias após a aplicação de BTH	05 b
Desafio 7 dias após a aplicação de BTH	04 b
Desafio 8 dias após a aplicação de BTH	07 b
Desafio 9 dias após a aplicação de BTH	06 b
Desafio 10 dias após a aplicação de BTH	17 a

\* Na coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, 5% de probabilidade.

Tabela 9. Efeito da aplicação de reguladores de crescimento e BTH sobre a replicação do vírus VMFS-EUA em folhas primárias de feijoeiro Moruna nc (hipersensível) e Jalo (hospedeiro).

Tratamento	PTA- ELISA
	D.O .405 nm
Planta sadia	0,334
Invasão sistêmica (Jalo)	1,185
Jalo tratado com ácido salicílico	0,352
Jalo tratado com BTH	0,397
Jalo tratado com 6-BA	1,228
Reação de hipersensibilidade (Moruna nc)	0,603
Moruna nc tratado com ácido salicílico	0,317
Moruna nc tratado com BTH	0,323
Moruna nc tratado com 6-BA	0,982

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Proposta de um esquema geral para a interpretação dos resultados

Um esquema relacionando entre si os diferentes resultados obtidos é proposto na figura 27 (página 85). A seguir, cada item presente no esquema será discutido separadamente, e o esquema será discutido de uma forma geral no item 5.13 deste capítulo. Segundo esta proposta, o vírus, ao infectar a célula do cultivar hipersensível (Moruna nc), desencadeia na célula a reação de hipersensibilidade que é caracterizada pela ocorrência de necrose.

### 5.2. Necrose celular e as formas ativas de oxigênio

Um dos primeiros eventos que levam à necrose nas células hipersensíveis invadidas por vírus é a perda do controle osmótico o qual coincide com a ruptura da membrana plasmática, e a destruição das membranas das organelas celulares. As células perdem os eletrólitos como uma consequência das modificações irreversíveis na membrana plasmática (Kato & Misawa, 1976). O período de aproximadamente 7 horas antes do aparecimento das lesões necróticas em que foi relatado aumento no vazamento de eletrólitos, em plantas de fumo Xanthi nc infectadas com TMV, indica que há uma correlação entre a formação das lesões e um dano prévio nas membranas celulares (Westeiijn, 1978). A ocorrência de peroxidação de lipídeos não foi observada em tecidos infectados por vírus sem a ocorrência de necrose (Doke & Ohashi, 1988). Entretanto, Keppler & Novacky (1986) observaram aumento de peroxidação de lipídeos em pepinos infectados com *P. syringae* pv. *lachrymans* numa interação compatível, mas o nível de dano à membrana foi inferior e mais tardio ao observado nas interações de incompatibilidade.

Aqui, foi observado que o conteúdo de malonaldeído aumentou nas folhas de feijoeiro Moruna nc que estavam com suas células necrosadas em função da inoculação com VMFS-EUA (fig.9). O MDA é um sub-produto da peroxidação da porção lipídica da membrana celular. Quanto maior seu conteúdo, significa que houve maior dano oxidativo à membrana celular. O surto oxidativo está correlacionado com a ocorrência da reação de hipersensibilidade em diversos modelos de planta-patógeno e desta forma pode ser um elemento importante que contribui para o desenvolvimento da resistência induzida (Mehdy, 1994). Em aveia inoculada com *Dreschlera avenae* ou *Dreschlera siccans* foi observado que a formação de lesões necróticas coincidiram com a liberação de radicais de oxigênio, 62 horas após a inoculação (Gönner *et al.*, 1993). A ativação de um sistema de geração de  $O_2^-$  dependente de NADPH foi observada em cultivares de fumo que continham o gene N, que confere resistência ao TMV (Doke & Ohashi, 1988). Para os autores, tal reação de liberação de  $O_2^-$  está envolvida na indução das lesões necróticas causadas pela infecção viral. Há hipóteses, nas quais os autores defendem a idéia de que as formas ativas de oxigênio produzidas como resposta à entrada do patógeno têm um efeito antimicrobiano direto e também atuam como ativadores de mecanismos de defesa, que incluem a produção de ligninas, a peroxidação de lipídeos, a produção de fitoalexinas e a resposta de hipersensibilidade (Baker & Orlandi, 1995).

Tem sido proposto que há dois mecanismos relacionados à ocorrência da reação de hipersensibilidade. O primeiro, seria de que o reconhecimento do patógeno ativa a morte geneticamente programada das células vegetais, ou seja, a apoptose. E o segundo mecanismo seria de que a reação celular destinada a combater o patógeno produz substâncias ou radicais livres que também são tóxicos às células (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

### 5.3. Relação dose-resposta na hipersensibilidade e na resistência adquirida

Nos experimentos sobre o efeito da concentração viral do inóculo na expressão da resposta de hipersensibilidade em feijoeiro Morunan nc, foi observado que quanto maior o número de partículas virais aplicadas na inoculação, maior foi o número de lesões locais produzidas, tanto em plantas mantidas em casa de vegetação como em câmara de crescimento e em ambos sistemas de inoculação (fig. 1 e 2). A reação de hipersensibilidade é definida como a morte das células hospedeiras que ocorre em poucas horas após o contato com o patógeno e é altamente dependente do número de partículas infectivas do inóculo (Goodman, 1986). Matthews (1991) demonstrou claramente a relação entre o número de partículas virais na inoculação e a resposta de hipersensibilidade. Quanto maior a concentração viral na inoculação, maior foi o número de lesões locais necróticas ocorridas nas folhas.

Nos experimentos, não foi observada diferença entre o sistema de inoculação de meia-folha e o sistema de inoculação sistêmica quanto à ocorrência de hipersensibilidade, indicando que o fato de se trabalhar com folhas de diferentes idades fisiológicas não exerceu influência sobre o número de lesões necróticas (fig. 3 e 4). Em outros modelos, a idade da folha pode ser de grande importância. Por exemplo, em *Vigna sinensis* inoculada com CMV ocorre menor produção de lesões quando as folhas destas plantas possuem 12 dias de idade, quando comparadas com folhas de 7 dias de idade. Por outro lado, folhas jovens de fumo Xanthi nc ou Samsun NN produzem menos lesões necróticas (mas geralmente de maior tamanho) do que as folhas mais velhas. Estas observações representam o resultado de diversas interações bioquímicas e fisiológicas, e explicações mais precisas sobre tal comportamento ainda não foram obtidas (Goodman, 1986).

Quando o vírus VMFS-EUA foi inoculado na indução, o número de lesões necróticas produzidas foi semelhante em casa de vegetação e em câmara de crescimento. No entanto, as

plantas da câmara de crescimento apresentaram a formação de lesões na folha desafiada nas concentrações de 5, 2,5 e 1,7  $\mu\text{g/mL}$ , o que não ocorreu na da casa de vegetação (fig. 1). Este resultado indica que na casa de vegetação a expressão de resistência foi mais eficiente, pois se manifestou em concentrações menores de inóculo aplicado na indução. Provavelmente, a temperatura exerceu influência na ocorrência da resistência adquirida, pois na casa de vegetação as temperaturas além de não terem sido constantes como na câmara de crescimento, foram em média superiores aos 25<sup>o</sup>C mantidos na câmara de crescimento. De fato, Raskin (1992) salientou a importância da temperatura na resistência sistêmica adquirida. Neste trabalho, o autor concluiu que no modelo fumo Xanthi nc inoculado com TMV a 32<sup>o</sup>C a expressão da resistência é suprimida, enquanto que na temperatura de 24<sup>o</sup>C a mesma é ativada.

A morte celular associada à infecção pelo patógeno é um requisito necessário para a ativação biológica da resistência sistêmica adquirida (Hunt *et al.*, 1996). Para Sticher *et al.* (1997), o nível de proteção pode variar dependendo do organismo utilizado para a inoculação de indução e principalmente do grau de ocorrência da necrose, ou seja, morte celular.

Tanto no sistema de inoculação e desafio de meia-folha primária como na indução da folha primária e desafio da segunda trifoliolada na casa de vegetação, observou-se que o número de lesões produzidas na indução decresceu de acordo com o aumento da diluição do vírus, e que todos os tratamentos de indução permitiram a ocorrência de resistência. Já na câmara de crescimento o número de lesões aumentou na porção desafiada da folha conforme a produção destas lesões na indução foi menor, evidenciando que ocorre influência do número de lesões na indução da resistência (fig. 3 e 4).

No presente trabalho é possível deduzir que nas plantas cultivadas em câmara de crescimento o número de lesões necróticas ocorridas na indução foi determinante para a ocorrência de resistência, e na casa de vegetação as condições ambiente propiciaram maior

expressão da resistência adquirida, dependendo menos do número de lesões ocorridas na indução.

#### **5.4. Influência dos fatores ambientais na ocorrência de hipersensibilidade e expressão da resistência adquirida**

##### **5.4.1. Radiação luminosa**

Nos experimentos realizados com variação experimental da radiação luminosa incidente, não foi observada nenhuma diferença na ocorrência de hipersensibilidade e na expressão da resistência adquirida, indicando que a intensidade da luz não se constitui num fator importante em Moruna nc inoculado com VMFS-EUA (fig. 5).

O sombreamento das plantas pode aumentar o tamanho das lesões necróticas produzidas, como no caso de plantas de feijoeiro inoculadas com AMV (Goodman, 1986). Em alguns casos, o aumento observado no tamanho das lesões tem sido correlacionado a mudanças bioquímicas, como o decréscimo na taxa de produção de calose. Tais correlações no entanto não se constituem em prova de uma relação casual, e os mecanismos envolvidos nestas diferenças permanecem sem serem esclarecidos.

Além disto, provavelmente as plantas submetidas ao tratamento de pleno sol tenham sofrido inibição fotossintética devido ao excesso de radiação recebida (média de 1936  $\mu\text{mol./m}^2.\text{s}$ , apêndice 2) fato que pode ter prejudicado a expressão da resistência adquirida nestas plantas.

##### **5.4.2. Temperatura**

Nos experimentos realizados, se observou que na temperatura de 15<sup>0</sup>C praticamente não ocorreu a formação de lesões necróticas (fig. 6). Como as plantas desenvolveram tais

lesões após serem transferidas para uma temperatura mais elevada (tabela 2), seria possível imaginar que se tratasse de uma infecção subliminar. Um exemplo de infecção subliminar é a hipersensibilidade do feijoeiro ao vírus do mosaico comum (VMFC), conferida pelo gene dominante I (Ali, 1950). Neste modelo a temperatura alta favorece a aparição de necrose. Outros autores comentam que em temperaturas inferiores ( $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ) não ocorrem lesões locais, nem invasão sistêmica. Nestas temperaturas a restrição da infecção viral é tão eficiente e rápida que não ocorre o aparecimento perceptível de necrose (Zeitlin & Hull, 1987). O que diferencia esta resposta da imunidade é o aparecimento das lesões com o tratamento de alta temperatura após a inoculação. Entretanto, no caso do feijoeiro Moruna nc, o que se observou foi um adiamento no aparecimento das lesões necróticas, provavelmente associado à baixa atividade metabólica do feijoeiro na baixa temperatura ( $15^{\circ}\text{C}$ ). Portanto, este caso não é de infecção subliminar. É importante ressaltar que a temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$  é justamente a temperatura base para o feijoeiro, ou seja, nesta temperatura as plantas mantêm apenas um metabolismo basal. Isto significa que o crescimento e o desenvolvimento são limitados nesta faixa de temperatura, como de fato foi observado nos experimentos (fig. 8). Logo, provavelmente o não aparecimento das lesões a  $15^{\circ}\text{C}$  tenha sido provavelmente decorrente do metabolismo lento da planta nesta temperatura.

Ainda em relação à temperatura, foi observado que foram produzidas lesões de maior tamanho nos tratamentos de temperaturas mais baixas (fig. 7). Portanto, é possível que nestas temperaturas ocorra um espalhamento maior do vírus, seguido de necrose celular, resultando em lesões maiores. Embora tenha sido relatado no modelo de hipersensibilidade composto pelo feijoeiro infectado pelo TMV, que em tratamentos de alta temperatura apresenta a formação de lesões locais cujo diâmetro aumenta proporcionalmente à duração do tratamento,

há relato de redução do tamanho das lesões em feijoeiro do grupo “Pinto” inoculado com o VMFS-EUA em temperaturas elevadas (Goodman *et al.*, 1986).

A expressão da hipersensibilidade, embora seja afetada por fatores ambientais como temperatura e idade da planta, é determinada pelo genoma tanto do hospedeiro como do vírus. Em alguns casos, a hipersensibilidade pode ser controlada por um único gene dominante da planta. *Nicotiana glutinosa*, por exemplo, apresenta a resposta de hipersensibilidade ao TMV, e esta característica é controlada pelo gene N. Este gene também foi introduzido no fumo Samsun NN e Xanthi nc, os quais são hipersensíveis ao TMV em temperaturas próximas de 22°C. Em temperaturas mais elevadas, acima de 28°C, as lesões são cloróticas ao invés de necróticas, e a infecção se espalha sistemicamente (Samuel, 1931).

#### **5.5. Duração da resistência adquirida**

O tempo de aparecimento, taxa de expansão e tamanho das lesões também são dependentes do vírus e do hospedeiro, e das condições ambientais. No caso do feijoeiro Moruna nc inoculado com o VMFS-EUA, as lesões necróticas geralmente atingiram seu tamanho final em torno de 72 horas após a inoculação. Há relatos de que algumas lesões aparecem rapidamente, como por exemplo, em fumo Samsun NN no qual lesões provocadas por TMV surgem 28 horas após a inoculação a 24°C. Alternativamente, as lesões causadas por PVS em *Chenopodium quinoa* demoram para aparecer cerca de 5 dias após a inoculação e se tornam bem definidas aos 8 dias. Enquanto algumas lesões apresentam crescimento definido quando aparecem, outras continuam se expandindo por um período variável de tempo (horas, dias, ou indefinidamente) (Shukla & Hiruki, 1975).

O dano celular nas lesões necróticas induzidas em feijoeiro do grupo “Pinto” inoculado com TMV torna-se visível 30 horas após a inoculação e as lesões atingem seu tamanho final

em 72 horas. Há pouca morte nas células do mesófilo e epiderme inferior, embora o colapso celular devido à necrose das células da epiderme superior e células palissádicas seja claramente evidente (Goodman, 1986).

Nos experimentos sobre a duração da expressão da resistência adquirida em *Moruna* nc, foi demonstrado que este fenômeno apresenta a duração de cerca de 22 dias, tanto no sistema de inoculação de meia-folha primária como no sistema de indução sistêmica, ocorrendo reduções superiores a 90% no número de lesões produzidas durante o desafio (tabelas 3 e 4). Lucas (1999) relatou o caso de fumo inoculado com *Peronospora tabacina*, no qual a resistência adquirida manteve-se efetiva durante um período de cerca de três semanas. Para este autor, esta é uma das condições necessárias para que o modelo estudado seja considerado como um caso de resistência sistêmica adquirida.

Como podemos verificar, o fenômeno de resistência sistêmica adquirida é altamente complexo, envolvendo diversos processos metabólicos e fisiológicos e apresenta ampla variação entre os diversos modelos estudados. No entanto, há certas características em comum, que têm sido usadas para definir se determinado sistema planta/patógeno se enquadra no conceito de resistência sistêmica adquirida. Lucas (1999) resumiu estas características:

- 1) É um fenômeno induzido por agentes ou patógenos que causam necrose, isto é, lesões locais na planta;
- 2) Há um período de alguns dias entre a indução e a sua total expressão;
- 3) A proteção é conferida aos tecidos não expostos ao inóculo utilizado na indução;
- 4) É expressa sob a forma de redução no número de lesões, tamanho das lesões, produção de esporos, e multiplicação do patógeno utilizado no desafio;
- 5) A proteção é duradoura, na maioria das vezes dura semanas ou até meses;

- 6) A proteção é não-específica, isto é, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos não relacionados ao agente indutor;
- 7) O sinal da resistência sistêmica adquirida é translocado pela planta e/ou transmissível por enxertia;
- 8) A proteção não é transmitida para a progênie; e a transmissão para tecidos propagados vegetativamente ainda não está muito bem esclarecida.

No caso do modelo composto pelo feijoeiro Moruna nc inoculado com VMFS-EUA, as condições de número 1,2,3,4,5 e 7 (descrito no item 5.7) foram satisfeitas. As condições 6 e 8 não foram testadas no presente trabalho. Desta forma, podemos concluir que efetivamente estamos tratando de um modelo de resistência sistêmica adquirida.

#### **5.6. Provável papel da enzima PAL na expressão da resistência adquirida**

No presente trabalho, a PAL teve sua atividade detectada a partir de 24 horas após a inoculação de indução do feijoeiro Moruna nc com o VMFS-EUA, e até mesmo as folhas não inoculadas tiveram a atividade desta enzima incrementada (fig. 18). Isto significa que provavelmente ocorreu ativação sistêmica. Em *Arabidopsis* este gene é ativado logo após a inoculação com *Pseudomonas* (Dong *et al.*, 1991) e codifica para a enzima chave da rota de síntese dos compostos fenilpropanóides. Esta rota é responsável pela produção de moléculas envolvidas no processo de defesa por parte da planta, incluindo fitoalexinas, ácido salicílico e outros compostos fenólicos (Wobbe & Klessig, 1996). O gene que codifica para a PAL é um dos marcadores usados para estudar a ativação gênica durante a resistência adquirida. A enzima PAL tem sua atividade aumentada em várias reações típicas de resistência e após o tratamento com vários elicitores de reações de defesa (Davis *et al.*, 1989; Hahlbrock & Scheel,

1989). Além disto, a inibição da PAL *in vivo* por inibidores específicos reduz a resistência em várias plantas (Carver *et al.*, 1994; Mauch-Mani & Slusarenko, 1996).

Nas plantas, o ácido salicílico é provavelmente produzido a partir da fenilalanina (Yalpani *et al.*, 1993). Este aminoácido é convertido a ácido trans-cinâmico pela PAL e o ácido salicílico pode ser produzido a partir do ácido cinâmico via um dos dois intermediários: ácido benzóico ou ácido *o*-cumárico (Yalpani *et al.*, 1993).

### **5.7. Envolvimento do ácido salicílico**

No caso do feijoeiro Moruna nc inoculado com VMFS-EUA, foram observados aumentos dos teores de ácido salicílico presente tanto nas folhas induzidas, como nas não inoculadas (fig. 20 e 21), e este metabólito também apresentou aumento na seiva do floema (fig. 19), indicando que o ácido salicílico está envolvido na expressão da resistência adquirida neste modelo de estudo e que é transportado pela planta de uma região inoculada para outra região mais distante. Quando aplicado exogenamente, o ácido salicílico induziu resistência no feijoeiro Moruna nc (fig. 22), evidenciando novamente o seu envolvimento na transdução de sinal que leva à expressão da resistência adquirida. Todos estes dados indicam o envolvimento do ácido salicílico na sequência de eventos que levam à manifestação de resistência.

O primeiro trabalho em que o ácido salicílico foi apontado como sendo uma molécula envolvida na defesa vegetal foi apresentado por White (1979). Ele observou que a injeção de aspirina ou ácido salicílico em folhas de fumo ocasionava aumento da resistência ao TMV e síntese das proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) (White & Antoniw, 1991). Esta observação inicial mostrou se repetir contra vários outros patógenos, tais como outros vírus, bactérias e fungos (Weete, 1992; Malamy *et al.*, 1992). O ácido salicílico também induz os genes que codificam para as PRs em outras espécies vegetais, tanto de monocotiledôneas

como dicotiledôneas (Klessig & Malamy, 1994). No entanto, nem todos os modelos de planta-patógeno respondem à aplicação de ácido salicílico (Roggero & Pennazio, 1991).

Uma prova mais direta sobre o envolvimento do ácido salicílico foi apresentada em estudos com fumo e pepino. Após a inoculação de fumo hipersensível com TMV, os níveis de ácido salicílico aumentaram em ambas as folhas induzida e a não inoculada. Tal estímulo na produção de ácido salicílico ocorreu simultaneamente com a ocorrência da reação de hipersensibilidade e a indução das proteínas PR. Ao contrário, não foi observado incremento na quantidade de ácido salicílico nas folhas de fumo suscetíveis ao TMV (Malamy *et al.*, 1990). Em pepino infectado com TNV, *Colletotrichum lagenarium* (Métraux *et al.*, 1990) ou *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Rasmussen *et al.*, 1991), os níveis de ácido salicílico aumentaram no exudato do floema. Enquanto o ácido salicílico é tóxico para alguns patógenos tais como *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium oxysporum* e *Agrobacterium tumefaciens*, ele não é tóxico para o TMV ou *C. lagenarium* (Mills & Wood, 1984). Logo, o aumento na resistência associada à maiores quantidades de ácido salicílico não pode ser associado ao efeito tóxico deste composto sobre os patógenos.

No caso do feijoeiro Moruna nc, foram observados aumentos no ácido salicílico total presente nas folhas que estavam expressando resistência (fig. 20), e maior quantidade deste ácido conjugado presente na seiva do floema (tabela 6). Portanto, é possível que o ácido salicílico esteja envolvido na transdução de sinal pela planta, encontrando-se sob diversas formas químicas para que o sistema seja regulado de forma a permitir uma produção eficiente, ou pelo menos manutenção, de concentrações bioativas de ácido salicílico sem no entanto causar fitotoxicidade.

Altas concentrações de ácidos fenólicos tais como o ácido salicílico são fitotóxicas. Então, muitos destes compostos existem na forma conjugada com açúcares (Umetani *et al.*,

1990). Enyedi e colaboradores (1992) descobriram que após a inoculação de fumo com TMV, uma grande quantidade de ácido salicílico estava presente na forma conjugada. Em fumo, o ácido salicílico, livre e conjugado, são encontrados ao redor do sítio de infecção, enquanto que somente o ácido salicílico livre é detectado nas regiões mais distantes (Malamy *et al.*, 1992). Em pepino e *Arabidopsis* tanto o ácido salicílico livre como o conjugado aumentam localizadamente e sistemicamente quando as plantas são inoculadas (Mewly & Métraux, 1993; Summermatter *et al.*, 1995).

Quando o ácido salicílico foi aplicado exogenamente no feijoeiro Moruna nc, o seu efeito foi observado somente até 60 horas após sua aplicação (fig.22). Provavelmente este ácido aplicado foi metabolizado pela planta, perdendo a sua atividade.

Os mecanismos pelos quais o ácido salicílico induz a produção das proteínas PR e a resistência sistêmica adquirida não estão totalmente esclarecidos até o presente momento. Parece que os produtos da peroxidação de lipídeos gerados durante a reação de hipersensibilidade desempenham um papel importante no desenvolvimento da resistência adquirida nos tecidos não infectados. Foi descoberto que o ácido salicílico age bloqueando a enzima catalase (Chen *et al.*, 1993) e também inibe a ascorbato peroxidase (Durner & Klessig, 1996), ambas enzimas que degradam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em contraste, guaiacol peroxidase não é inibida pelo ácido salicílico (Wobbe & Klessig, 1996). No sítio de infecção onde acumulam-se elevados níveis de ácido salicílico, é provável que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atue na transmissão do sinal após a atuação do ácido salicílico. Alternativamente, ou em adição, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode funcionar como estímulo para a produção de mais ácido salicílico. Finalmente, o ácido salicílico pode apresentar outros mecanismos de ação que ainda não foram descobertos (Chen *et al.*, 1993).

A aplicação exógena de ácido salicílico acarretou em menor taxa de replicação viral, tanto nas plantas com infecção sistêmica como nas plantas com reação de hipersensibilidade

(tabela 9). Foi relatado que o ácido salicílico interfere tanto na replicação de TMV (Chivasa *et al.*, 1997) como no movimento à longa distância no caso de CMV (Naylor *et al.*, 1998).

### **5.8. Peroxidase e resistência adquirida**

No caso da reação de hipersensibilidade estudada no feijoeiro Moruna nc, foi possível verificar aumento na atividade da peroxidase 48 horas após a inoculação, ou seja, antes do aparecimento das lesões necróticas (fig. 17). Posteriormente, tal enzima apresentou maior atividade nas plantas que estavam expressando resistência adquirida (fig. 11). Deste modo, fica evidente que a peroxidase desempenha alguma função na resistência.

A enzima peroxidase é amplamente distribuída e de larga ocorrência nas plantas, e uma das suas principais funções como integrante do complexo celular é assegurar a desintoxicação das formas ativas de oxigênio. Tal função é muito importante na formação das respostas metabólicas das plantas aos variados estresses. Tem sido relatado o envolvimento desta enzima em diferentes estresses causados pelo ambiente, tais como efeito do ozônio (Castillo *et al.*, 1984), danos por poluição atmosférica (Castillo *et al.*, 1987), metais pesados (Van Asshe & Clijsters, 1990), elevada radiação (Bakardjieva & Christova, 1991) e indução de resistência a patógenos (Martinez *et al.*, 1996). A peroxidase produzida pelas plantas está presente sob múltiplas formas de isoenzimas. Elas apresentam diversos papéis nas células vegetais, algumas delas são excretadas e participam em muitas reações, incluindo lignificação, ligações dos polissacarídeos de parede celular, oxidação do ácido 3-indolacético, regulação do alongamento celular e oxidação de fenóis (Gaspar *et al.*, 1991). Entretanto, ainda não está muito claro quais isoenzimas são responsáveis pelas várias funções das peroxidases, especialmente nos casos de estresse. Em estudo sobre o efeito tóxico do cobre, foi demonstrado que os efeitos iniciais na mudança da permeabilidade da membrana plasmática e

atividade das peroxidases pôde ser detectada antes do aparecimento de qualquer sinal visível de toxicidade (De Vos *et al.*, 1989).

No caso do feijoeiro Moruna nc, é possível que a peroxidase tenha atuado nos processos de desintoxicação e remanejamento das formas ativas de oxigênio geradas durante a reação de hipersensibilidade, além de atuar diretamente na lignificação das células mortas durante a necrose. Além disto, há relato de que a peroxidase tem a capacidade de utilizar o ácido salicílico como substrato (Lobarzewski *et al.*, 1996), o que é perfeitamente possível de ter ocorrido no feijoeiro hipersensível, uma vez que ocorreu incremento na quantidade produzida deste composto durante a expressão da resistência adquirida.

#### **5.9. Envolvimento da enzima catalase**

O fato de se ter observado aumento da atividade catalásica nas folhas onde ocorreu invasão sistêmica do VMFS-EUA e esta enzima não apresentar maior atividade nas folhas com reação de hipersensibilidade e expressão de resistência adquirida, indica que possivelmente ocorreu uma diferenciação quanto à fisiologia nos dois tipos de interação do feijoeiro com este vírus (fig. 10). Provavelmente, no caso de infecção sistêmica, o metabolismo foi todo direcionado para a desintoxicação das formas ativas de oxigênio geradas no processo de infecção. Enquanto isto, na reação de hipersensibilidade as formas ativas de oxigênio podem desempenhar papel importante na transdução de sinal. Desta forma, o surto oxidativo geraria diferentes formas de oxigênio, que por sua vez seriam utilizadas como compostos mediadores da cascata de sinalização que conduz à expressão da resistência adquirida. De fato, foi observado que as enzimas PER e PAL tiveram suas atividades aumentadas nos tratamentos onde ocorreram a reação de hipersensibilidade e a expressão da resistência sistêmica adquirida em feijoeiro Moruna nc (fig. 11 e 12).

A atividade da enzima catalase geralmente aumenta em resposta aos elevados níveis de  $H_2O_2$  na tentativa de atuar como um mecanismo de proteção celular (Halliwell & Gutteridge, 1989). No entanto, em estudo a respeito da peroxidação de lipídeos nas interações de compatibilidade e de reação de hipersensibilidade ao VMFS-EUA, Beleid El-Moshaty e colaboradores (1993) não observaram alterações significativas na atividade da catalase nas folhas que estavam apresentando a reação de hipersensibilidade ao referido vírus. Estes autores sugeriram que neste caso, o  $H_2O_2$  pode ter sido reduzido pelas peroxidases, as quais apresentam sua atividade aumentada durante a reação de hipersensibilidade ao vírus.

Foi observado que a CAT apresentou, de um modo geral, maior atividade nas folhas primárias do feijoeiro (fig. 14). Este fato provavelmente seja decorrente das folhas primárias serem fisiologicamente mais velhas do que a segunda folha trifoliolada.

#### **5.10. Aplicação de citocininas**

A aplicação de citocinina em feijoeiro Moruna nc não causou a indução de resistência ao VMFS-EUA (tabela 7). Desde a década de 60 há relatos de que as citocininas poderiam aumentar a resistência das plantas às moléstias (Ingram, 1967). Outros trabalhos indicaram que ocorreu supressão da resposta de hipersensibilidade mediada pela aplicação de citocininas em raízes de tomate infectadas pelo nematóide *Meloidogyne incognita* (Dropkin et al., 1969) e fumo infectado com *Pseudomonas tabaci* (Novacky, 1972). Estes trabalhos sugerem que as citocininas possam atenuar a reação de hipersensibilidade aos fungos, bactérias e nematóides. Entretanto, outros experimentos apresentaram resultados contrários. Por exemplo, o tratamento de folhas com citocininas aumentou a resposta de hipersensibilidade ao *Erysiphe graminis* em centeio (Liu & Bushnell, 1986), e também incrementou a reação de hipersensibilidade de fumo ao TMV (Király & Szirmai, 1964). No presente trabalho,

observou-se aumento na replicação do VMFS-EUA quando as plantas de feijoeiro foram tratadas com citocinina (tabela 9). Este comportamento já havia sido relatado por Vega (1995) neste mesmo modelo. Provavelmente as diferenças nos resultados encontrados entre os diversos trabalhos sejam devidas à aplicação de diferentes concentrações deste regulador de crescimento.

#### **5.11. Relação entre resistência sistêmica adquirida e bactérias no solo**

Embora relatos salientem a influência da nodulação sobre a expressão de resistência, no presente estudo não se verificou nenhum efeito da nodulação na ocorrência deste fenômeno (tabela 5). Os experimentos realizados foram todos de duração relativamente curta, e mesmo que os nódulos já tivessem sido formados, talvez não tenha havido tempo suficiente para que as modificações bioquímicas ocorressem. Estas modificações normalmente ocorrem durante o amadurecimento dos nódulos, ativando os genes envolvidos na nodulação, que são responsáveis pelos processos de indução de resistência na planta nodulada. Martínez-Abarca *et al.* (1998) aplicaram ácido salicílico exogenamente em plantas de alfafa noduladas com *Rhizobium meliloti* e observaram que houve inibição da expressão gênica durante a nodulação. No caso dos experimentos realizados com o feijoeiro Moruna nc, ocorreu aumento no conteúdo endógeno de ácido salicílico quando as plantas estavam expressando a resistência adquirida (fig. 20); no entanto o conteúdo de ácido salicílico não foi avaliado nas plantas noduladas. Mesmo assim, pode-se supor que tal composto tenha interagido com as bactérias noduladoras, reduzindo seus efeitos sobre a ocorrência da resistência adquirida.

Quando o efeito da nodulação sobre a peroxidação de lipídeos e a atividade das enzimas PER e PAL foram avaliadas, verificou-se que a nodulação não exerceu nenhuma influência sobre estes parâmetros, reiterando o que já foi discutido anteriormente, ou seja, a

nodulação não afetou a expressão da resistência adquirida em feijoeiro *Moruna* nc inoculado com VMFS-EUA (fig. 13, 15 e 16). Quanto à enzima CAT, aparentemente a nodulação afetou sua atividade, pois em alguns tratamentos a CAT apresentou maior atividade na segunda folha trifoliolada (fig. 15). Este comportamento foi diferentemente observado anteriormente nas plantas não noduladas (fig. 10). No entanto, esta diferença na atividade da CAT não foi o suficiente para alterar os mecanismos de SAR em *Moruna* nc.

Além da questão das bactérias envolvidas na fixação de nitrogênio, cabe ressaltar que as rizobactérias não-patogênicas podem induzir, em plantas, resistência sistêmica fenotipicamente semelhante à resistência sistêmica adquirida. A resistência sistêmica induzida mediada pelas rizobactérias ("induced systemic resistance", ISR) foi demonstrada atuando contra fungos, bactérias e viroses em *Arabidopsis*, feijão, pepino, fumo e tomate sob condições nas quais a bactéria indutora de resistência e o patógeno utilizado no desafio permaneceram espacialmente separados. As estirpes de bactérias diferem na sua habilidade em induzir resistência nas diferentes espécies vegetais, e as plantas apresentam variação na expressão da ISR sob indução por estirpes específicas. Os compostos determinantes de ISR pelas bactérias incluem lipopolissacarídeos, sideróforos e ácido salicílico. Não foram observadas até o momento, no hospedeiro vegetal, alterações consistentes associadas ao estado de indução, mas sob condições de inoculação de desafio as respostas típicas de resistência são aceleradas e aumentadas. A ISR é efetiva mesmo sob condições de campo e oferece um mecanismo natural para o controle biológico das moléstias (van Loon *et al.*, 1998). Entretanto, torna-se necessário a realização de estudos nesta área de conhecimento, que foi descoberta somente nos últimos anos.

### 5.12. Efeito do BTH na expressão da resistência sistêmica

A aplicação de BTH no feijoeiro Moruna nc estimulou a ocorrência da resistência adquirida apenas quando o produto foi aplicado nas doses de 2,5 e 5 g/100L (fig. 23). Este produto foi desenvolvido para a proteção de cereais, arroz, fumo, banana e certos vegetais contra moléstias causadas principalmente por fungos e bactérias (Ruess *et al.*, 1995). Entretanto, o BTH tem sido testado no mundo inteiro, e tem sido demonstrado que ele é um ativador de resistência adquirida em diversas espécies vegetais inoculadas, inclusive, com vírus. Para pepinos por exemplo, o produto tem sido utilizado na dose de 2g/100L conferindo resistência de amplo espectro à cultura (Hammerschmidt, comunicação pessoal). Há a indicação de que o BTH age como um análogo do ácido salicílico (Kessmann *et al.*, 1996).

O fato de ter sido observado em feijoeiro Moruna nc que após a aplicação do BTH ocorreu maior atividade da enzima peroxidase e não da enzima PAL e de que o conteúdo de ácido salicílico destas plantas praticamente se manteve inalterado, indica que provavelmente o BTH ative mecanismos de defesa numa etapa posterior ao acúmulo do ácido salicílico (fig. 24 a 26). De fato, em estudo com plantas de *Arabidopsis NahG* (bloqueadas para a síntese de ácido salicílico) foi demonstrado que o BTH induz a resistência sistêmica adquirida de modo independente do acúmulo de ácido salicílico, evidenciando que este produto atua no metabolismo posteriormente à sinalização do ácido salicílico (Lawton *et al.*, 1996). No entanto, é importante salientar que o fenômeno de resistência causado pelo BTH no feijoeiro Moruna nc foi de duração relativamente curta, fato que compromete a sua aplicação comercial nesta cultura (tabela 8).

### 5.13. Discussão geral do esquema proposto

O esquema proposto na figura 27 foi elaborado com o intuito de relacionar os dados observados nos experimentos, e propor uma sequência de eventos que explique o fenômeno da resistência adquirida no feijoeiro Moruna nc inoculado com o VMFS-EUA.

Ao infectar as células epidérmicas da variedade hipersensível (nc= necrose), o vírus é reconhecido pela hospedeira e então começa o processo de morte celular, ou necrose. No caso estudado, a extensão da necrose foi dependente da quantidade de inóculo (ou partículas virais) presente na indução, e da temperatura ocorrida na indução. A radiação luminosa não exerceu influência na reação de hipersensibilidade. Uma vez que o processo de morte celular foi iniciado, foram geradas formas ativas de oxigênio, que provavelmente reagiram com a membrana celular, causando a peroxidação de lipídeos (evidenciada pelo aumento no conteúdo de MDA nas células necrosadas). Por outro lado, a enzima PAL teve sua atividade aumentada tanto localizadamente como sistemicamente. Uma vez que a aplicação de BTH não induziu aumento na atividade da PAL, deve existir outro mensageiro, provavelmente ligado à peroxidação de lipídeos, que provoca este aumento da atividade desta enzima nas folhas não inoculadas. No entanto, os dados observados não permitem especular sobre a natureza deste evento. Como a PAL é a enzima chave para a síntese de ácido salicílico (e observou-se aumento deste composto nas folhas resistentes), é muito provável que esta enzima tenha estimulado a biossíntese do ácido salicílico. O grande aumento no conteúdo de ácido salicílico encontrado na seiva do floema da folha induzida, e o fato dele estar em grande parte na sua forma conjugada, permite concluir que este ácido tenha sido transportado sob diferentes formas para as regiões distais na planta de feijoeiro, atuando como um mensageiro para a expressão da resistência sistêmica adquirida. Além disto, a aplicação de ácido salicílico demonstrou que este composto é indutor de resistência em feijoeiro, evidenciando novamente



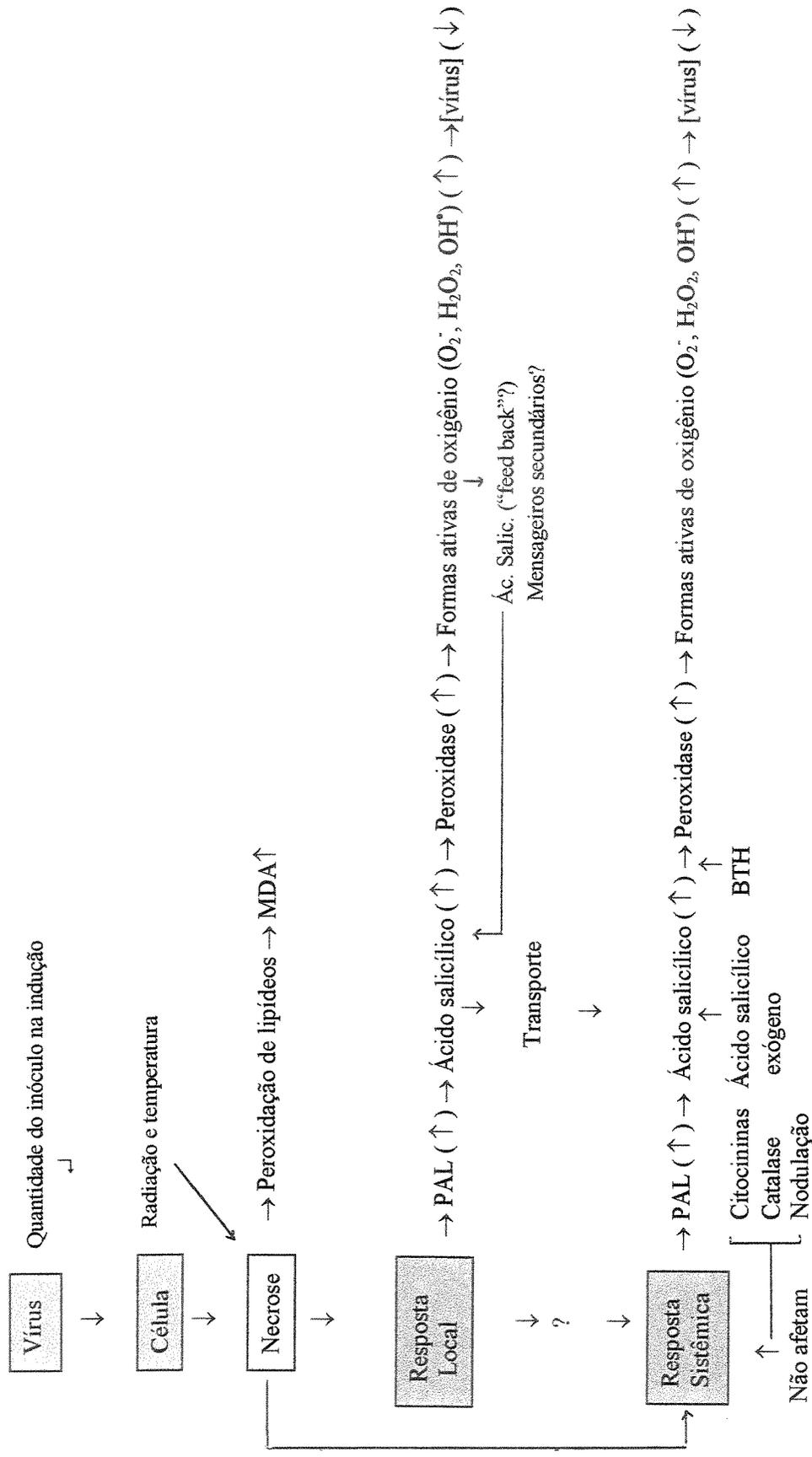


Figura 27. Esquema proposto para a interpretação dos resultados obtidos no presente trabalho.



sua importância na ocorrência da resistência adquirida. Outro fato que reitera o envolvimento do ácido salicílico, é o de que houve aumento na sua quantidade nas folhas não inoculadas da planta, decorrente da inoculação de indução nas folhas primárias.

Por sua vez, o ácido salicílico provavelmente induz aumento da atividade da PER, ou esta pode ter tido sua atividade aumentada em função das formas ativas de oxigênio, presentes em decorrência da reação de hipersensibilidade. Provavelmente ocorreram aumentos nas formas  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^*$ , que podem ter agido como mensageiros secundários e/ou atuado no mecanismo de estimulação da síntese “de novo” do ácido salicílico. Tanto as formas ativas de oxigênio, como o ácido salicílico causaram uma redução na concentração viral das folhas que estavam expressando resistência adquirida.

O BTH análogo ao ácido salicílico, também induziu resistência sistêmica no feijoeiro *Moruna nc*. Entretanto, como a aplicação de BTH não acarretou em aumento de atividade da enzima PAL nem do próprio ácido salicílico, e sim da enzima peroxidase, é possível que tal composto químico atue numa etapa posterior à transdução de sinal realizada pelo ácido salicílico. Além disto, em função destes resultados, é provável que a maior ativação da peroxidase ocorra posterior ou conjuntamente à atuação do ácido salicílico.

Nem a nodulação por *Rhizobium tropici*, nem a aplicação de citocinina 6-BA exerceram algum tipo de influência sobre o fenômeno da resistência adquirida no feijoeiro *Moruna nc*. A enzima catalase também não teve sua atividade aumentada nas plantas que estavam expressando a resistência sistêmica adquirida.

#### 5.14. Considerações finais

A complexidade das respostas das plantas ao ataque dos vírus sugere que múltiplos sinais devem estar operando através de diversas rotas metabólicas para produzir as várias reações de defesa. Em adição à indução de defesa localizada, há também a indução da resistência sistêmica adquirida, a qual requer um ou mais sinalizadores capazes de mover-se a longas distâncias desde o sítio de indução (infecção inicial) até as porções distais da planta. Trabalhos recentes têm identificado vários candidatos em potencial para serem as moléculas sinalizadoras de longa distância. Dentre eles incluem-se sistemina (McGurl *et al.*, 1992), jasmonatos (Farmer *et al.*, 1992), ácido salicílico (Wobbe & Klessig, 1996), etileno (Yang & Pratt, 1978) e potenciais elétricos (Wilson *et al.*, 1992).

A nível bioquímico, uma ampla variedade de processos são ativados durante a resposta de resistência. Muitos destes processos estão envolvidos no incremento do sistema passivo de defesa da planta, principalmente através do aumento da rigidez da parede celular. Aí estão incluídos a síntese e incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, celulose e lignina na parede celular e a deposição de calose e suberina na mesma. Além disto, há um aumento na atividade da peroxidase, a qual é necessária para a lignificação e pode estar envolvida na ligação das proteínas da parede celular. Vários mecanismos ativos de defesa também são induzidos incluindo a síntese de inibidores de protease, os quais bloqueiam a atividade das proteases microbianas e de insetos, a produção de fitoalexinas com atividade anti-microbiana, a indução de atividades hidrolíticas, tais como chitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases que degradam a parede celular dos micróbios, e finalmente a produção de compostos de atividade anti-viral. A maioria dos extratos com atividade anti-viral produzidos pelas plantas têm sido relatados quando se observa a resistência localizada. Este tipo de resistência é manifestado apenas nas áreas onde a aplicação exógena é realizada. Tais extratos anti-virais

manifestam sua atividade em estágios iniciais da infecção dos vírus nas plantas (Baranwal & Verma, 1992). A utilidade prática destes inibidores de vírus causando resistência localizada tem sido questionada pela comunidade científica (Verma *et al.*, 1998).

A indústria agroquímica tem um grande interesse na descoberta de compostos que possam agir diretamente contra os patógenos via mecanismos endógenos de defesa da planta. A elucidação dos mecanismos de ativação e expressão da resistência sistêmica adquirida tem tornado possível maiores avanços na descoberta destes ativadores de resistência adquirida. No entanto, ainda há muitas questões não resolvidas a respeito do seu uso, tais como o tempo ótimo e método de aplicação nas diferentes culturas, integração com outros tipos de pesticidas, e interações com a fisiologia da planta. Estes químicos estão, por definição, alterando a expressão gênica e o metabolismo, com possíveis efeitos no crescimento e desenvolvimento das culturas. Há diferenças intrigantes quanto à eficiência dos ativadores químicos de resistência nas diferentes espécies vegetais estudadas. Ainda não está claro se estas diferenças são devidas às variações inerentes à absorção e resposta à dose aplicada, ou se elas refletem diferenças reais na indução e regulação das rotas metabólicas envolvidas na expressão da resistência adquirida.

A despeito das aplicações práticas da exploração do fenômeno de resistência adquirida na proteção para as culturas, o melhor conhecimento deste fenômeno e especialmente sua relação com outras respostas ativas de defesa vegetal, será de grande valor no desenvolvimento de estratégias genéticas para o melhoramento das culturas visando resistência a patógenos e pestes.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- 1) O sistema composto pelo feijoeiro Moruna não inoculado com o VMFS-EUA se constitui num exemplo de reação de hipersensibilidade com conseqüente ativação da expressão de resistência adquirida, pois atende aos requisitos descritos na literatura, que caracterizam tal fenômeno.
- 2) A reação de hipersensibilidade neste modelo é mais intensa em altas temperaturas, e a expressão da resistência sistêmica adquirida é função do grau de necrose ocorrido na inoculação de indução.
- 3) Durante a indução da resistência ocorre a peroxidação de lipídeos nas folhas inoculadas e as enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase são ativadas nestas folhas.
- 4) Nas folhas não inoculadas, mas induzidas, ocorre aumento da atividade da PAL e da PER, mas não há aumento da peroxidação de lipídeos.
- 5) O teor de ácido salicílico aumenta significativamente nas folhas inoculadas e não inoculadas e também é detectado na seiva das folhas induzidas, indicando que este composto tem papel importante no mecanismo de resistência adquirida.
- 6) O produto BTH, análogo ao ácido salicílico, induz aumento da atividade da PER, mas não da PAL, mesmo assim levando à manifestação de resistência adquirida.



## 7. LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. 1998. Plant Pathology. Academic Press, London.
- Ali, M.A. 1950. Genetics of resistance to the common bean mosaic virus (bean virus 1) in the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology* 40:69-79.
- Bakardjieva, N.T.; Christova, N. 1991. Effect of metal ions on the photosensitivity of peroxidase system in plants to visible light. In: Biochemical, molecular and physiological aspects of peroxidases. (J. Lobarzevski; H. Greppin; C. Penel; T.H. Gaspar, eds). University of Geneva, 495-499.
- Baker, C.J.; Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321.
- Baranwal, V.K.; Verma, H.N. 1992. Localized resistance against virus infection by leaf extract of *Celosia cristata*. *Plant Pathol.* 41:633-638.
- Beckman, K.B.; Ingram, D.S. 1994. The inhibition of the hypersensitive response of potato tuber tissues by cytokinins: similarities between senescence and plant defence responses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44:33-50.
- Beleid El-Moshaty, F.I.; 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. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43:109-119.
- Cameron, R.K.; Dixon, R.A.; Lamb, C.J. 1994. Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 5:715-725.
- Carver, T.L.W.; Zeyen, R.J.; Bushnell, W.R.; Robbins, M.P. 1994. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative

- susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.). *Physiol . Mol. Plant Pathol.* 44:261-272.
- Castillo, F.J.; Penel, C.; Greppin, H. 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves: involvement of  $Ca^{2+}$ . *Plant Physiol.* 74:846-851.
- Castillo, F.J.; Miller, P.C.; Greppin, H. 1987. Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to norway spruce. *Experientia* 43:111-115.
- Cataldo, D.A.; Haroon, M.; Schadrer, L.E.; Youngs, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* , v.6, 1:71-80.
- Chen, Z.; Silva, H.; Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1886.
- Chivasa, S.; Murphy, A.M.; Naylor, M.; Carr, J.P. 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *The Plant Cell*, 9:547-557.
- Cohen, Y.; Kuc, J. 1981. Evaluation of systemic resistance to Blue Mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Phytopathology* 71:783-787.
- Corrizosa, M.T.; Espitia, H.Z. 1992. Determinacion de la fenilalanina amonio-liasa en extratos de quatro variedades de cafeto y en otros tejidos vegetales. Bogotá, Colômbia, tese de Graduação.
- Cupertino, F.P.; Lin, M.T.; Kitajima, E.W.; Costa, C.L. 1980. Ocorrência no Brasil do vírus do mosaico do sul do feijoeiro ("Southern Bean Mosaic Virus"). *Fitopatol. Brasileira*, v. 5, 3:395-396.

- Dangl, J.L.; Dietrich, R.A.; Richberg, M.H. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* 8:1793-1807.
- Davis, K.R.; Schott, E.; Ausubel, F.M. 1991. Virulence of selected phytopathogenic *Pseudomonas* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:477-488.
- Dawson, W.O.; Hilf, M.E. 1992. Host-range determinants of plant viruses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 43:527-555.
- De Vos, R.H.C.; Schat, H.; Vooijs, K.; Ernst, W.H.O. 1989. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J. Plant Physiol.* 135:164-169.
- Dhindsa, R.S.; Plumb-Dhindsa, P.; Thorpe, T. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 126:93-101.
- Doke, N.; Ohashi, Y. 1988. Involvement of  $\text{NaO}_2^-$  generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:163-175.
- Dong, X.; Mindrions, M.; Davis, K.R.; Ausubel, F.M. 1991. Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant Cell* 3:61-72.
- Dropkin, V.H.; Helgesson, J.P.; Upper, C.D. 1969. The hypersensitive reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: reversal by cytokinins. *J. Nematol.* 1:55-61.
- Durner, J.; Klessig, D.F. 1996. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chemis.* 271:28492-28501.
- Durner, J.; Shah, J.; Klessig, D. 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Sci.* 2:243-283.

- Elliston, J.E.; Kuc, J.; Williams, E.B. 1971. Induced resistance to bean antracnose at a distance from the site of the inducing interaction. *Phytopathology* 61:1110-1112.
- 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 2480-2484.
- Farmer, E.E.; Johnson, R.R.; Ryan, C.A. 1992. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 98:995-1002.
- Gaspar, T.H.; Penel, C.; Hagege, D.; Greppin, H. 1991. Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: *Biochemical, molecular and physiological aspects of peroxidases.* (J. Lobarzevski; H. Greppin; C. Penel; T.H. Gaspar, eds). University of Geneva, 29-280.
- Gönner, M. von; Schlösser, E.; Neubacher, H. 1993. Evidence from electron-spin resonance for the formation of free radicals during infection of *Avena sativa* by *Dreschlera* spp. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 42:405-412.
- Goodman, R.N.; Király, Z.; Wood, K.R. 1986. Resistance to infection. In: *The biochemistry and physiology of plant disease.* 1 ed., University of Missouri, pp.347-368.
- Halbrock, K.; Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 40:347-369.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine.* Clarend Press, Oxford.
- Hammerschmidt, R.; Acres, S.; Kuc, J. 1976. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* and *Cladosporium cucumerinum*. *Phytopathology* 66:790-793.
- Hammond-Kosack, K.E.; Jones, J.D.G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8:1773-1791.

- Handel, E.V. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22:280-283.
- Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. 1938. The water culture method for growing plantes without soil. *Calif. Agric. Exp. Stat. Bull.* 347:36-39.
- Hooft van Huijsduijnen, R.A.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 infection in various plant species. *J. Gen. Virol.* 67:2135-2143.
- Hull, R. 1977. The banding behavior of the viruses of the Southern Bean Mosaic Virus group in gradients of caesium sulphate. *Virology* 79:50-57.
- Hunt, M.D.; Neuenschwander, U.; Delaney, T.P.; Weymann, K.B.; Friedrich, L.B.; Lawton, K.A.; Steiner, H.; Ryals, J.A. 1996. Recent advances in systemic acquired resistance research- a review. *Gene* 179: 89-95.
- Ingram, D.S. 1967. The expression of R-gene resistance to *Phytophthora infestans* in tissue cultures of *Solanum tuberosum*. *J. Gen. Microbiol.* 49:99-108.
- Karban, R.; Carey, J.R. 1984. Induced resistance of cotton seedlings to mites. *Science* 225:53-54.
- Kato, S.; Misawa, T. 1976. Lipid peroxidation during the apperance of hypersensitive reaction in cowpea leaves infected with cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 42: 472-480.
- Keppler, L.D.; Novacky, A. 1987. The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30:233-245.
- Kessmann, H.; Staub, T.; Hofmann, C.; Maetzke, T.; Herzog, J.; Ward, E.; Uknes, S.; Ryals, J. 1994. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439-459.

- Kessmann, H.; Oostendorp, M.; Ruess, W.; Staub, T.; Kunz, W.; Ryals, J. 1996. Systemic activated resistance – a new technology for plant disease control. *Pesticide Outlook* 7:10-13.
- Király, Z.; Szirmai, J. 1964. The influence of kinetin on tobacco mosaic virus production in *Nicotiana glutinosa*. *Virology* 23:286-288.
- Klessig, D.F.; Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1439-1458.
- Kuc, J.; Richmond, S. 1977. Aspects of the protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* 67:533-536.
- Lawton, K.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Kessmann, H.; Staub, T.; Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10:71-82.
- León, J.; Lawton, M.A.; Raskin, I. 1995. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108:1673-1678.
- Liu, Z.; Bushnell, W.R. 1986. Effects of cytokinins on fungus development and host response in powdery mildew of barley. *Physiol. Plant Pathol.* 29:41-52.
- Lobarzewski, J.; Bryska, M.; Greppin, H. 1996. The fungal peroxidase kinetics with some phenolics hydrogen donors in relation to lignin degradation. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. (C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, C. Penel, H. Greppin, eds). University of Geneva, 153-155.
- Lucas, J. A. 1999. Plant immunisation: from myth to SAR. *Pesticide Science* 55:193-196.
- Lück, H. 1965. Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis*. (H.U. Bergmeyer, ed), Verlag Chemie/Academic Press, Weinheim/New York, pp.885-894.

- Madamanchi, N.R.; Kuc, J. 1991. Induced systemic resistance in plants. In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals.(G.T. Cole; H.C. Hoch, eds), Plenum, New York, pp.347-362.
- Malamy, J.; Carr, J.P.; Klessig, D.F.; Raskin, I. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Science* 250:1001-1004.
- Malamy, J.; Hennig, J.; Klessig, D.F. 1992. Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4:359-366.
- Malamy, J.; Klessig, D.F. 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2:643-654.
- Martínez-Abarca, F.; Herrera-cervera; J.A.; Bueno, P.; Sanjuan, J.; Bisseling, T.; Olivares, J. 1998. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*- alfafa symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, v.11, 2: 153-155.
- Martinez, C.; Geiger, J.P.; Bresson, E.; Daniel, J.F.; Daí, G.H.; Andray, A.; Nicole, M. 1996. Isoperoxidases are associated with resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. (C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, C. Penel, H. Greppin, eds). University of Geneva,322-327.
- Matthews, R.E.F. 1981. *Plant Virology*. Academic Press, New York, pp. 897.
- 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*. *The Plant Cell* 8:203-212.
- McGurl, B.; Pearce, G.; Orizco-Cardensa, M.; Ryan, C. 1992. Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255:1570-1573.

- McIntyre, J.L.; Dodds, J.A. ; Hare, J.D. 1981. Effects of localized infections of *Nicotiana tabacum* by tobacco mosaic virus on systemic resistance against diverse pathogens and an insect. *Phytopathology* 71:297-301.
- McKhann, H.I.; Paiva, N.L.; Dioxin, R.A. ; Hirsute, A . M. 1997. Chalcone synthase transcripts are detected in alfafa root hairs following inoculation with wild-type *Rhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:50-58.
- Mehdy, M. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105:467-472.
- Mehdy, M.C.; Sharma, Y.K.; Sathasivan, K.; Bays, N.W. 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plant.* 98: 365-374.
- Mendes, M.A.; Eberlin, M.N. 2000. Trace level analysis of VOCs and semi-VOCs in aqueous solution using a direct insertion membrane probe and trap and release membrane introduction mass spectrometry. *Analyst* 125:21-24.
- Métraux, J.P.; Signer, H.; Ryals, J.; Ward, E.; Wiss-Benz, M.; Gaudin, J.; Raschdorf, K.; Schmidt, E.; Blum, W.; Inverardi, B. 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006.
- Mewly, P.; Métraux, J.P. 1993. *Ortho-anisic* acid as internal standart for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal. Biochem.* 214:500-505.
- Mills, P.R.; Wood, R.K.S. 1984. The effects of polyacrylic acid, aspirin and salicylic acid on resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathol. Z.* 111:209-216.
- Mowat, W.P.; Dawson, S. 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude extracts and unfractionated antisera. *J. Virol. Meth.*, 15:233-247.

- Naylor, M.; Murphy, A.M.; Berry, J.O.; Carr, J.P. 1998. Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v.11, 9:860-868.
- Neo, H.H.; Layzell, D.B. 1997. Phloem glutamine and the regulation of O<sub>2</sub> diffusion in legume nodules. *Plant Physiol.* 113: 259-267.
- Neuenschwander, U.; Vernooij, B.; Fridrich, L.; Uknes, S.; Kessman, H.; Ryals, J. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8:227-233.
- Neuenschwander, U.; Lawton, K.; Ryals, J. 1996. Systemic acquired resistance. In: *Plant-Microbe Interactions* (G. Stacey; N.T. Keen, eds) Vol.1, Chapman and Hall, pp. 81-106.
- Niehaus, K.; Kappa, D.; Pühler, A. 1993. Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules and exopolysaccharidase (EPS-I) deficient *Rhizobium meliotti* mutant. *Planta* 190:415-425.
- Novacky, A. 1972. Suppression of the bacterially induced hypersensitive reaction by cytokinins. *Physiol. Plant Pathol.* 2:101-104.
- Perotto, S.; Brewin, N.J.; Kannenberg, E.L. 1994. Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:99-112.
- Peyrano, G.; Taleinsnik, E.; Quiroga, M.; Forchetti, S.M. de; Tiger, H. 1997. Salinity effects on hydraulic conductance, lignin content and peroxidase activity in tomato roots. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 35, 5: 387-393.
- Pieterse, C.M.J.; van Wees, S.C.M.; Hoffland, E.; van Pelt, J.A.; van Loon, L.C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of

- salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 8:1225-1237.
- Purvis, A. C.; Shewfelt, R.L. 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiol. Plant.* 88:712-718.
- Queiroz, C.G.S. 1997. Avaliação do estresse por resfriamento em raízes de café: identificação dos danos oxidativos por microcalometria, espectrometria EPR e atividade de enzimas antioxidantes. UNICAMP, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Raskin, I. 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol* 43: 439-463.
- Rasmussen, J.B.; Hammerschmidt, R.; Zook, M.N. 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* 97:1342-1347.
- Roggero, P.; Pennazio, S. 1991. Salicylate does not induce resistance to plant viruses or stimulate pathogenesis-related protein production in soybean. *Microbiologica* 14:65-69.
- Ruess, W.; Kunz, W.; Staub, T.; Müller, K.; Poppinger, N.; Speich, J.; Ahl Goy, P. 1995. Plant activator CGA 245704, a new technology for disease management. *Eurp. J. Plant. Pathol.* 101, supl. 424.
- Ryals, J.A.; Neuenschwander, U.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H.; Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1809-1819.
- Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:425-449.
- Samuel, G. 1931. Some experiments on inoculating methods with plant viruses, and on local lesions. *Ann. Appl. Biol.* 18:494-507.

- Savouré, A .; Sallaud, C.; El-Turk, J.; Zuanazzi, J.; Ratet, P.; Schultze, M.; Kondorosi, A . ;  
Kondorosi, E. 1997. Distinct response of *Medicago* suspension cultures and roots to Nod factors and chitin oligomers in the elicitation of defense-related responses. *Plant J.* 11:277-287.
- Sehgal, O.P. 1981. Southern bean mosaic virus group. In: Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis (E, Kurstak, ed) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp.91-121.
- Shukla, P.; Hiruki, C. 1975. Ultrastructural changes in leaf cells of *Chenopodium quinoa* infected with potato virus S. *Physiol. Plant Pathol.* 7:189-194.
- 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.
- Smith, J.A. ; Métraux, J.P. 1991. *Pseudomonas syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39:451-461.
- Spaink, H.P. 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:345-368.
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, J.P. 1997. Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- Summermatter, K.; Stcher, L.; Métraux, J.P. 1995. Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 108:379-1385.
- Uknes, S.; Winter, A.; Delaney, T.; Vernooij, B.; Friedrich, L.; Morse, A.; Potter, S.; Ward, E.; Ryals, J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:692-698.

- Umetami, Y.; Kodakari, E.; Yamamura, T.; Tanaka, S.; Tabata, M. 1990. Glucosylation of salicylic acid by cell suspension cultures of *Mallotus japonicus*. *Plant Cell Rep.* 9:325-327.
- Van Asshe, F.; Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13:195-206.
- Van Handel, E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.; Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-483.
- Vasse, J.; de Billy, F.; Truchet, G. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfafa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* 4:555-566.
- Vega, J. 1991. Mecanismo de resistência ao vírus do mosaico da soja da variedade IAC-2. UNICAMP, Campinas, São Paulo, tese de Doutorado.
- Vega, J. 1995. Aplicação de citocinina influencia a resposta de feijoeiro ao vírus do mosaico do sul dos EUA. In: V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, V, Lavras, MG, p.6, 1995.
- Verma, H.N.; Baranwal, V.K.; Srivastava, S. 1998. Antiviral substances of plant origin. In: *Plant virus disease control* (A. Hadidi; R.K. Khetarpal; H. Koganezawa, eds). APS Press, St. Paul, pp.154-1162.
- Vernooij, B.; Friedrich, L.; Goy, R.A.; Staub, T.; Kessman, H.; Ryals, J. 1995. 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:228-234.
- Weete, J.D. 1992. Induced systemic resistance to *Alternaria cassiae* in sicklepod. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40:437-445.

- Westeijn, E.A. 1978. Permeability changes in the hypersensitive reaction of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc after infection with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 13:253-258.
- White, R.F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99:410-412.
- White, R.F.; Antoniwi, J.F. 1991. Virus-induced resistance responses in plants. *Crit. Rev. Plant. Sci* 9:443-455.
- Wilson, D.C.; Thain, J.F.; Minchin, P.E.H.; Gubb, I.R.; Reilly, A.J.; Skipper, Y.D.; Doherty, H.M.; O'Donnel, P.J.; Bowles, D.J. 1992. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 360:62-65.
- Wobbe, K.K.; Klessig, D.F. 1996. Salicylic acid – an important signal in plants. In: *Signal transduction in plant growth and development* (E.S. Dennis; B. Hohn; T. Meins; J. Schell; D.P.S. Verma, eds) Springer-Verlag, Wien/ New York, pp.167-196.
- 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, S.F.; Pratt, H.K. 1978. The physiology of ethylene in wounded plant tissue. In: *Biochemistry of wounded plant tissues*.(G. Wahl, ed). Walter de Gruyter, Berlin, pp.595-622.
- Zeitlin, M.; Hull, R. 1987. Plant virus-host interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:291-315.



## **APÉNDICE**



Apêndice 1. Temperaturas observadas na UNICAMP, Campinas/SP, durante o decorrer do experimento 3.2.1.

POSTO METEOROLÓGICO -FEAGRI/UNICAMP  
TEMPERATURA MÍNIMA DIÁRIA - ANO DE 1997

DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT
1	20,4	20,2	19,8	19,0	13,8	9,8	15,0	10,6	17,0	18,8
2	21,0	20,0	19,0	20,0	14,8	10,0	14,0	12,0	14,8	19,4
3	19,8	19,8	19,8	19,5	15,6	10,2	15,2	14,7	14,6	16,0
4	20,0	20,2	16,2	18,5	16,2	13,6	15,8	16,4	18,2	13,8
5	20,2	20,0	20,2	18,5	16,8	14,2	14,8	16,4	19,2	20,8
6	19,8	19,2	20,4	18,0	15,0	15,2	14,0	15,0	17,0	21,8
7	18,0	20,4	20,2	18,2	14,0	12,0	16,8	13,2	15,8	17,6
8	21,2	20,8	19,4	18,0	15,6	5,4	15,8	15,2	16,2	17,4
9	20,0	19,8	20,8	16,9	17,2	5,8	14,8	10,8	17,2	17,2
10	20,8	19,0	22,0	19,5	14,8	8,4	12,2	8,6	21,0	19,0
11	20,4	19,4	20,4	16,0	15,2	7,0	12,4	9,6	16,2	20,4
12	21,4	20,4	19,0	15,0	13,2	10,8	13,8	9,0	14,0	20,0
13	22,0	20,6	19,4	17,0	13,2	12,2	13,2	13,4	18,6	19,0
14	21,8	18,4	20,8	17,0	12,2	13,4	12,8	11,4	20,6	19,6
15	20,6	20,8	22,0	18,0	14,4	13,8	11,2	11,8	20,0	20,0
16	21,2	21,0	20,8	19,6	15,4	12,0	13,4	10,8	15,6	20,8
17	20,6	19,2	20,0	17,0	14,8	9,8	14,0	10,8	14,6	16,2
18	19,8	20,0	18,8	18,2	13,2	13,2	15,4	13,8	15,0	16,0
19	20,2	18,6	18,4	17,8	13,4	14,4	13,8	15,0	16,2	16,2
20	21,6	19,4	18,8	18,0	12,8	17,2	13,4	15,4	18,0	18,2
21	20,4	19,8	18,6	19,8	12,6	13,8	14,8	14,8	18,2	18,2
22	21,4	22,0	18,6	19,6	17,0	15,2	12,2	16,2	17,0	16,2
23	20,2	21,8	19,0	16,8	13,2	13,2	11,0	17,6	14,8	15,0
24	20,2	21,4	17,0	16,0	14,8	14,0	12,6	16,2	15,8	16,4
25	20,8	20,4	19,0	14,8	14,2	13,2	13,4	14,4	17,4	18,6
26	21,2	20,2	18,8	18,0	10,8	12,8	10,8	10,8	17,8	18,8
27	20,2	19,0	18,4	15,8	12,8	14,8	10,0	12,8	18,2	18,0
28	19,8	20,2	19,2	14,8	13,4	16,0	9,4	14,4	17,0	18,4
29	20,2	XX	20,0	12,6	13,0	17,2	10,0	14,4	21,4	19,2
30	21,2	XX	20,2	13,8	9,4	15,2	10,8	16,0	18,0	19,0
31	20,4	XX	20,0	XX	10,2	XX	12,4	15,8	XX	19,3
MÉDIA	20,5	20,1	19,5	17,4	14,0	12,5	13,2	13,5	17,2	18,2
MÁX.	22,0	22,0	22,0	20,0	17,2	17,2	16,8	17,6	21,4	21,8
MÍN	18,0	18,6	16,2	12,6	9,4	5,4	9,4	8,6	14,0	15,0

POSTO METEOROLÓGICO - FEAGRI/UNICAMP  
 TEMPERATURA MÁXIMA DIÁRIA - ANO DE 1997

DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT
1	29,0	30,4	30,0	27,5	27,6	19,2	21,6	28,8	31,6	23,4
2	26,2	27,2	29,6	28,5	28,0	23,6	27,2	30,2	31,6	26,0
3	25,2	28,0	28,4	28,5	28,8	21,2	28,0	29,8	32,0	23,4
4	27,8	31,4	29,0	31,0	27,0	18,0	25,4	26,6	32,4	32,0
5	30,0	32,4	29,4	29,2	28,0	17,0	23,0	19,0	32,0	33,8
6	30,2	32,4	29,2	27,0	28,0	19,0	24,8	28,2	29,6	30,6
7	32,2	31,8	31,8	26,0	28,2	19,8	26,0	28,4	31,8	24,6
8	31,8	31,4	31,6	27,0	28,6	15,8	26,4	20,2	33,6	28,0
9	27,8	30,8	31,4	27,8	26,8	20,0	26,0	19,8	37,0	32,2
10	28,8	31,6	31,0	28,0	27,0	24,0	26,6	20,6	32,4	32,0
11	28,6	31,4	31,6	27,0	27,2	25,6	25,6	26,2	26,4	33,4
12	29,0	31,6	31,2	29,2	28,4	24,0	26,8	26,0	30,0	24,0
13	29,4	31,2	32,0	30,0	27,0	24,0	27,0	28,4	34,0	35,6
14	29,8	31,0	31,0	31,5	23,0	21,0	26,6	30,2	23,2	34,0
15	31,0	28,6	25,8	29,5	23,2	16,8	28,0	29,8	25,0	36,0
16	26,4	27,8	27,8	31,0	21,8	21,0	29,0	28,2	25,6	23,6
17	29,2	30,4	28,6	27,0	25,0	21,2	29,2	28,8	29,6	22,8
18	30,0	27,4	29,2	27,4	25,8	25,0	26,4	29,4	27,0	26,2
19	31,0	31,2	30,6	29,8	28,6	28,0	27,6	30,6	30,2	28,0
20	30,6	30,4	33,0	26,8	29,2	18,8	27,8	31,2	26,0	22,8
21	29,0	31,0	31,0	27,0	28,8	26,0	15,0	25,0	23,4	26,4
22	29,6	33,0	30,0	28,6	20,2	26,4	22,6	31,4	24,0	27,0
23	27,6	32,6	32,0	29,0	22,0	28,6	23,6	25,0	28,8	27,2
24	25,2	30,8	31,0	29,2	20,8	27,6	24,5	23,8	32,6	30,6
25	28,0	29,4	31,2	29,8	18,0	28,0	24,8	24,6	27,4	28,0
26	26,4	32,0	29,3	29,4	23,0	28,4	24,0	28,6	22,4	24,0
27	28,0	31,6	29,0	29,6	26,0	23,0	24,2	32,0	27,2	29,6
28	29,8	30,2	28,8	28,6	17,6	23,2	26,8	31,4	31,2	32,6
29	30,6	XX	28,2	28,6	20,2	24,4	27,8	31,2	31,2	31,8
30	32,0	XX	25,0	27,4	19,6	22,6	26,4	31,4	29,6	30,9
31	30,2	XX	22,5	XX	19,0	XX	28,6	31,6	XX	32,4
MÉDIA	29,0	30,7	29,7	28,6	24,9	22,7	25,7	27,6	29,3	28,8
MÁX.	32,2	33,0	33,0	31,5	29,2	28,6	29,2	32,0	37,0	36,0
MÍN.	25,2	27,2	22,5	26,0	17,6	15,8	15,0	19,0	22,4	22,8

Apêndice 2. Fluência da radiação observada no decorrer do experimento 3.2.2.

\* Radiação fotossinteticamente ativa medida às 10 horas da manhã

Tratamento	PAR ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )		
	06/10/98	07/10/98	08/10/98
Pleno sol	1610	1782	1635
1 camada de sombrite	789	713,8	754,3
3 camadas de sombrite	140	126,8	132,7

\* Radiação fotossinteticamente ativa medida ao meio-dia.

Tratamento	PAR ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )		
	06/10/98	07/10/98	08/10/98
Pleno sol	1915	1960	1932
1 camada de sombrite	916,2	935,7	908,9
3 camadas de sombrite	186,5	160,3	172,1

\* Radiação fotossinteticamente ativa medida às 16 horas

Tratamento	PAR ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ )		
	06/10/98	07/10/98	08/10/98
Pleno sol	1447	1502	1456
1 camada de sombrite	678,9	702,5	651
3 camadas de sombrite	133,2	123,8	172,1

Apêndice 3. Determinação do conteúdo de nitrato e sacarose presentes na seiva de floema de pecíolo de feijoeiro Moruna nc resistente ao VMFS-EUA.

Repetições	Nitrato ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sacarose ( $\mu\text{g/mL}$ )
Amostra I	0.034	0.703
Amostra II	0.049	0.625
Amostra III	0.035	0.601
Amostra IV	0.037	0.642
Amostra V	0.041	0.590
Amostra VI	0.045	0.680
Amostra VII	0.033	0.702
Amostra VIII	0.042	0.620
Amostra IX	0.044	0.681
Amostra X	0.036	0.622