

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE *Fusarium* spp. E NA INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA POR ACIBENZOLAR-S-METHYL À MURCHA-DE-
CURTOBACTERIUM DO FEIJOEIRO**

RAFAEL MOREIRA SOARES

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia – Área de
Concentração em Proteção de Plantas.**

**BOTUCATU – SP
Agosto – 2001**

*“ **Aprender** é descobrir aquilo que você já sabe.*

***Fazer** é demonstrar que você o sabe.*

***Ensinar** é lembrar aos outros que eles sabem tanto quanto você.*

*Somos todos **aprendizes, fazedores e professores.**”*

Aos meus pais, Moisés e

Fernanda,

minha irmã , Flávia

e minha avó, I gnês

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Maringoni, pela orientação, amizade e respeito constantes.

- À Faculdade de Ciências Agrônomicas/UNESP – Botucatu, por possibilitar as condições necessárias para realização do curso.

- À FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

- À Profa. Dra. Giuseppina P. P. Lima pela amizade e orientação nas análises bioquímicas.

- Aos professores Chukichi Kurozawa, Nilton L. de Souza, Marcelo A. Pavan e Edson L. Furtado, pelos ensinamentos e amizade.

- Aos colegas do curso de pós-graduação pelo companheirismo constante.

- Aos funcionários do departamento de Produção Vegetal, da biblioteca e da seção de pós-graduação pela eficiência e presteza em ajudar.

- À DEUS pela saúde e proteção, que permitiram trilhar essa jornada.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. Murcha-de-Curtobacterium ou murcha bacteriana do feijoeiro.....	8
2.2. Controle biológico de doenças.....	12
2.3. Indução de resistência.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Obtenção e caracterização dos isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>Fusarium</i> spp.....	20
3.1.1. Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	21
3.1.2. Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	22
3.2. Estudo <i>in vitro</i> da produção de substâncias por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , inibitórias a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> .	23
3.3. Estudo <i>in vitro</i> da produção de substâncias por isolados não-patogênicos de <i>Fusarium</i> spp., inibitórias a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	25
3.4. Estudo da produção de substâncias <i>in vitro</i> por isolados de <i>Fusarium</i> spp., extraídas por filtração, inibitórias a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	25

3.4.1. Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sob agitação.....	25
3.4.2. Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sem agitação.....	27
3.5. Avaliação de isolados não-patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. no controle da murcha-de-Curtobacterium em feijoeiro, sob condições de casa-de-vegetação.....	27
3.6. Avaliação <i>in vitro</i> da ação de acibenzolar-S-methyl sobre <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	29
3.7. Avaliação da ação de acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e vigor de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.....	29
3.7.1. Tratamento de sementes de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl.....	30
3.7.1.1. Avaliação da germinação.....	30
3.7.1.2. Avaliação do vigor.....	30
3.7.1.3. Avaliação da indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.....	31
3.7.2. Efeito da pulverização em plantas de feijoeiro com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl, na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.....	32
3.7.3. Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes da inoculação da bactéria.....	33
3.7.4. Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes e após a inoculação da bactéria.....	33
3.7.5. Comparação da ação do acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, em cultivares de feijoeiro com diferentes níveis de resistência à doença.....	34
3.7.6. Análise da atividade de peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1) e nível de proteínas totais solúveis em três cultivares de feijoeiro pulverizadas com acibenzolar-S-methyl.....	36
4. RESULTADOS.....	39

4.1. Obtenção e caracterização dos isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> e <i>Fusarium</i> spp.....	39
4.1.1. Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	39
4.1.2. Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de <i>Fusarium</i> spp.....	40
4.2. Estudo <i>in vitro</i> da produção de substâncias por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> inibitórias a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> ..	42
4.3. Estudo <i>in vitro</i> da produção de substâncias por isolados não patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. inibitórias a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	45
4.4. Estudo <i>in vitro</i> da produção de substâncias por isolados de <i>Fusarium</i> spp., extraídas por filtragem, inibitórias a <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	46
4.4.1. Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sob agitação.....	46
4.4.2. Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sem agitação.....	46
4.5. Avaliação de isolados não-patogênicos de <i>Fusarium</i> spp. no controle da murcha-de- <i>Curtobacterium</i> em feijoeiro, sob condições de casa-de-vegetação.....	47
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> da ação de acibenzolar-S-methyl sobre <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	47
4.7. Avaliação da ação de acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e vigor de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de- <i>Curtobacterium</i>	48
4.7.1. Tratamento de sementes de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl.....	48
4.7.1.1. Avaliação da germinação.....	49
4.7.1.2. Avaliação do vigor.....	50
4.7.1.3. Avaliação da indução de resistência à murcha-de- <i>Curtobacterium</i>	52

4.7.2. Efeito da pulverização em plantas de feijoeiro com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl, na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.....	53
4.7.3. Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes da inoculação da bactéria.....	55
4.7.4. Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes e após a inoculação da bactéria.....	56
4.7.5. Comparação da ação do acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, em cultivares de feijoeiro com diferentes níveis de resistência à doença.....	58
4.7.6. Análise da atividade de peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1) e nível de proteínas totais solúveis em três cultivares de feijoeiro pulverizadas com acibenzolar-S-methyl.....	61
5. DISCUSSÃO	67
5.1. Controle biológico de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	67
5.2. Efeito do acibenzolar-S-methyl no tratamento de sementes de feijoeiro.....	70
5.3. Indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium com acibenzolar-S-methyl.....	71
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
1. Tratamentos para avaliação do acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de- <i>Curtobacterium</i> , em cultivares com diferentes níveis de resistência à doença.....	35
2. Tratamentos para avaliação da atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e nível de proteínas totais solúveis.....	36
3. Isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> obtidos de plantas de feijoeiro com sintomas de murcha.....	40
4. Isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de plantas de feijoeiro com sintomas de murcha.....	42
5. Diâmetro médio (mm) do halo de inibição formado por substâncias produzidas por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> , em meio de cultura semeado com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	43
6. Diâmetro médio (mm) do halo de inibição formado por substâncias produzidas por <i>Fusarium</i> spp., em meio de cultura com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	46
7. Avaliação dos sintomas da murcha-de- <i>Curtobacterium</i> em plantas de feijoeiro cultivar IAC Carioca inoculadas com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , cultivadas em vasos contendo substrato infestado com diferentes concentrações de <i>Fusarium</i> spp. não-patogênicos.....	48

8. Efeito de diferentes concentrações de acibenzolar-S-methyl aplicado em tratamento de sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, sobre a germinação.....	49
9. Avaliação do tratamento de sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium com acibenzolar-S-methyl.....	52
10. Avaliação da severidade dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium, em plantas tratadas com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl.....	53
11. Peso seco da parte aérea das plantas de feijoeiro inoculadas com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl, com e sem inoculação da bactéria.....	53
12. Avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium em plantas pulverizadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, antes da inoculação.....	55
13. Peso seco da parte aérea de plantas tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, antes da inoculação.....	56
14. Avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium em plantas tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl antes e após a inoculação.....	57
15. Peso seco da parte aérea de plantas de feijoeiro tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, antes e depois da inoculação com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	58
16. Severidade de sintomas da murcha-de-Curtobacterium, em três cultivares de feijoeiro, tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, cinco dias antes da inoculação.....	59
17. Porcentagem de redução do peso seco da parte aérea de três cultivares de feijoeiro, tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, cinco dias antes da inoculação.....	59

18. Área abaixo da curva de progresso da atividade de peroxidases em três cultivares de feijoeiro, com e sem pulverização de acibenzolar-S-methyl....	61
19. Área abaixo da curva de progresso da atividade de polifenoloxidasas em três cultivares de feijoeiro, com e sem pulverização de acibenzolar-S-methyl.....	62
20. Área abaixo da curva de progresso do nível de proteínas totais solúveis em três cultivares de feijoeiro, com e sem pulverização de acibenzolar-S-methyl.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sintomas da murcha-de- <i>Curtobacterium</i> , em feijoeiro aos 20 dias após a inoculação.....	41
2. Halo de inibição ao crescimento dos isolados de <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , Feij 2716 (A) e Feij 2720 (B), por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	44
3. Velocidade de emergência de sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, tratadas com diferentes doses de acibenzolar-S-methyl.....	51
4. Porcentagem de plantas normais de feijoeiro emergidas de sementes tratadas com diversas doses de acibenzolar-S-methyl.....	51
5. Peso seco da parte aérea de três cultivares de feijoeiro tratadas ou não com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, cinco dias antes da inoculação com <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	60
6. Atividade de peroxidases nas folhas (A) e caule (B) de cultivares de feijoeiro pulverizados ou não com acibenzolar-S-methyl.....	63
7. Atividade de polifenoloxidasas nas folhas (A) e caule (B) de cultivares de feijoeiro pulverizados ou não com acibenzolar-S-methyl	64
8. Nível de proteínas totais solúveis nas folhas (A) e caule (B) de cultivares de feijoeiro pulverizados ou não com acibenzolar-S-methyl....	65

RESUMO

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Cff) causa a murcha-de-Curtobacterium do feijoeiro, doença recentemente constatada no Brasil, na safra das águas de 1995, no Estado de São Paulo. Trata-se de um patógeno de colonização vascular e de difícil controle, sendo recomendados à utilização de cultivares resistentes, além de rotação de culturas e o uso de sementes sadias.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a ação inibitória de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium* spp., *in vitro*, sobre Cff e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, em plantas de feijoeiro cultivadas em vaso contendo substrato infestado com isolados de *Fusarium* spp. Teve também os objetivos de avaliar os efeitos do tratamento de sementes e da pulverização com acibenzolar-S-methyl, sobre plantas de feijoeiro e na indução de resistência à doença, sob condições de casa-de-vegetação, e as atividades de peroxidases, polifenoloxidasas e nível de proteínas totais solúveis nas folhas e no caule.

Os resultados observados mostraram que isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium* spp., cultivados sobre discos de papel-de-filtro em meio de cultura agarizado, inibiram o crescimento de Cff *in vitro* e os isolados de *Fusarium* spp. não foram eficazes no controle da murcha-de-Curtobacterium em plantas de feijoeiro. O tratamento de sementes com acibenzolar-S-methyl, nas dosagens de 25, 50 e 75 g i.a./100 Kg de sementes, foi prejudicial à germinação e ao vigor e não induziu resistência à doença; a pulverização de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl na dosagem de 250 µg i.a./mL foi fitotóxico e a dosagem de 100 µg i.a./mL não causou fitoxidez e foi ineficaz para induzir de resistência à murcha-de-Curtobacterium na cultivar suscetível (IAC Carioca), quando pulverizadas antes ou após a inoculação, ou incrementar a resistência de cultivares com

diferentes níveis de resistência à doença (IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã); a pulverização de acibenzolar-S-methyl (100 µg i.a./mL) em plantas de feijoeiro aumentou as atividades de peroxidases nas folhas e no caule, bem como de polifenoloxidasas e proteínas totais solúveis no caule.

Palavras chaves: *Phaseolus vulgaris*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, controle biológico, controle químico.

EFFECTIVENESS EVALUATION OF FUSARIUM SPP. AND ACIBENZOLAR-S-METHYL RESISTANCE INDUCTION TO BACTERIAL WILT OF COMMON BEAN. Botucatu, 2001. 85p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RAFAEL MOREIRA SOARES

Adviser: ANTONIO CARLOS MARINGONI

SUMMARY

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Cff) cause the bacterial wilt of common bean, disease recently observed in State of São Paulo, Brazil. It is a vascular colonization pathogen, difficult to be controlled, and the resistant cultivars utilization is the best control method, followed by crop rotation and health seeds use.

This work evaluated the *in vitro* inhibitory action of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *Fusarium* spp. over Cff and its effects in the resistance induction to the bacterial wilt in common bean plants, cultivated in vases with substrate infested with *Fusarium* spp. It was also evaluated the effects of seed treatment and spraying through the use of acibenzolar-S-methyl, on common bean plants, in the resistance induction to disease under greenhouse conditions. Peroxidases and polyphenoloxidases activities, and total soluble protein level were observed in the leaf and stem.

The results showed that *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* and *Fusarium* spp., cultivated on paper-filter discs on agar medium, inhibited the *in vitro* Cff growth, and the *Fusarium* spp. isolates were not efficient to induce resistance to bacterial wilt in common bean plants. The acibenzolar-S-methyl seed treatment (25, 50 and 75 g a.i./100

Kg of seeds) was prejudicial to germination and vigour, and it did not induce resistance to disease; spraying bean plants with 250 µg a.i./mL was phytotoxic, while with 100 µg a.i./mL it did not cause phytotoxicity, being either inefficient to induce resistance to bacterial wilt in the susceptible cultivar (IAC Carioca), spraying before or after inoculation, or to increase the resistance in cultivars with different levels of resistance (IAC Carioca Akytã and IAC Carioca Pyatã); the acibenzolar-S-methyl spraying (100 µg a.i./mL) increased the peroxidases activity in leaf and stem, as well as the polyphenoloxidases and total soluble protein level in the stem.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, biological control, chemical control.

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), entre outras leguminosas, é amplamente cultivado e consumido por milhões de pessoas em todo o mundo, servindo, principalmente como fonte de proteína na dieta básica tradicional de países latino-americanos. Também é uma importante fonte de fósforo, ferro e vitaminas (Bressani & Elias, 1980).

No ano de 2000, o Brasil foi considerado o segundo maior produtor mundial de feijão, com 4.336.273 de hectares cultivados e produção de 3.036.975 T, perdendo apenas para a Índia. A média de produtividade brasileira foi de 700,4 Kg/ha, praticamente igual à média mundial de 695,9 Kg/ha, e pode ser considerada muita baixa comparando-se com países como Chile, Argentina, Estados Unidos da América e muitos outros, que possuem médias de produtividade acima de 1.000 Kg/ha (FAO, 2000). A baixa produtividade brasileira se deve à predominância do cultivo em áreas com condições de solo e clima inadequados às cultivares disponíveis, visando a subsistência, sem uso de tecnologias agrônomicas adequadas. Um progresso nos índices de produtividade tem sido alcançado a partir da adoção do cultivo solteiro do feijoeiro, da irrigação, do correto

preparo e adubação do solo e da utilização de medidas fitossanitárias, como seleção de sementes, uso de cultivares resistentes às doenças e rotação de culturas (Vieira, 1988; Maringoni, 1993).

Entre diversos patógenos que causam doenças em feijoeiro, a bactéria *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones, causa a murcha-de-Curtobacterium ou murcha bacteriana, doença inicialmente descrita por Hedges (1922) em Dakota do Sul, nos E.U.A. No Brasil, essa doença foi constatada na safra das águas de 1995, no Estado de São Paulo (Maringoni & Rosa, 1996).

Fungos do gênero *Fusarium*, além de causarem doença à maioria das culturas de importância comercial, também têm demonstrado a potencialidade para atuarem como agentes antagonistas a patógenos fúngicos e bacterianos.

A interação entre hospedeiros e patógenos desencadeia mecanismos de resistência condicionados por genes específicos e não específicos, que parecem ter um efeito generalizado contra um amplo espectro de patógenos. A resistência sistêmica adquirida (SAR – Systemic Acquired Resistance) é uma das tantas respostas de plantas observadas na resistência contra patógenos e inicia-se em resposta à ação de um agente patogênico e torna a planta sistemicamente protegida contra infecções subsequentes causadas por um amplo espectro de patógenos, que normalmente são virulentos. Este amplo espectro de ação de SAR contrasta com a resistência específica contra raças de patógenos, proporcionadas por genes de resistência utilizados em plantas cultivadas e assim, pode ser menos suscetível a uma “quebra de resistência” (Moraes, 1998).

O acinbezolar-S-methyl (CGA 245.704) é uma molécula que interfere nos processos fisiológicos/bioquímicos das plantas, podendo ativar SAR. Esse ingrediente ativo pertence a classe química denominada benzothiadiazole (BTH) e é o primeiro representante de uma nova categoria de produtos utilizados na proteção de plantas, também chamados de

ativadores de plantas ou indutores de resistência. Juntamente com práticas agrícolas e defensivos químicos tradicionais, é um princípio capaz de ir de encontro às necessidades de uma agricultura sustentável.

Baseado nos fatos descritos acima, este trabalho teve como objetivos:

- Determinar se isolados de *Fusarium* spp. produzem substâncias inibitórias *in vitro* e *in vivo* ao desenvolvimento de Cff.

- Avaliar a ação de acinbezolar-S-methyl sobre sementes e plantas de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.

- Avaliar a ação de acinbezolar-S-methyl sobre atividades de peroxidases, polifenoloxidasas e nível de proteínas totais solúveis nas folhas e no caule de plantas de feijoeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Murcha-de-Curtobacterium ou murcha bacteriana do feijoeiro

Segundo Saettler (1991), os principais patógenos bacterianos que incidem sobre o feijoeiro, causando perdas na produção, são: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan et al., *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, *P. syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster) Young et al. e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones.

A murcha-de-Curtobacterium ou murcha bacteriana, causada por Cff foi constatada pela primeira vez por Hedges, em 1921, em Dakota do Sul, nos E.U.A., sendo o patógeno denominado *Bacterium flaccumfaciens* (Hedges, 1922). Com a abolição do gênero *Bacterium*, o patógeno passou a ser denominado *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson 1942. A partir da reclassificação das corinebactérias, antes classificadas todas no gênero *Corynebacterium*, surgiram os gêneros *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Curtobacterium* e *Rhodococcus*. Com isso, Collins e Jones, em 1983, propuseram a nomenclatura de Cff, atualmente aceita para designar o agente causal da

murcha-de-*Curtobacterium* do feijoeiro (Bradbury, 1986). Este patógeno também induz a “tan spot” em soja, mas com colonização não-vascular, ao contrário do que ocorre no feijoeiro, onde a colonização é vascular e a bactéria é transmitida pela semente (Saettler, 1991).

O patógeno é uma bactéria Gram positiva, aeróbia, apresentando bastonetes retos ou levemente curvados, na maioria individuais, mas podendo estar arranjados em forma de V, Y ou em paralelo, com um ou mais flagelos polares ou subpolares. A superfície das colônias em meio nutriente-glicose-ágar é brilhante, circular, de bordo liso, sem viscosidade, semi-fluída e amarela, laranja ou rosa, medindo 1 a 4 mm de diâmetro em 3 a 4 dias de cultivo. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 24-27°C (Bradbury, 1986; Saettler, 1991).

C. flaccumfaciens distingue-se das espécies de *Clavibacter* pelo crescimento mais rápido e pela presença de células flageladas móveis conforme Komagata & Suzuki, citados por Takatsu (1995).

Os sintomas da doença consistem em plantas amarelecidas, murchas ou com folhas flácidas durante períodos secos e quentes. A ocorrência da doença em plântulas pode levar à formação de plantas subdesenvolvidas ou causar a sua morte antes mesmo da formação do primeiro par de folhas. A murcha é resultado do bloqueio do movimento da água no sistema vascular da planta, causado pelas células bacterianas. A bactéria penetra através de ferimentos nas raízes, causados pelas práticas de cultivo e por nematóides, através dos cotilédones de sementes no processo de germinação e por ferimentos no caule, folhas e vagens. Não se tem relatos de penetração por estômatos, hidatódios ou outras aberturas naturais na parte aérea ou subterrânea da planta de feijão (Hedges, 1926; Burke & Seliskar, 1957; Schuster, 1959; Rickard & Walker, 1965).

A inoculação por imersão de folhas produz pústulas brancas. Inoculação no caule produz amarelecimento e necrose nas folhas.

Sementes infectadas podem apresentar escurecimento púrpura ou amarela, e plântulas provenientes destas sementes desenvolvem escurecimento púrpura no caule (Saettler, 1991).

A bactéria pode ser detectada por meio de vários métodos: sintomas foliares, observação de corrida bacteriana em microscópio, por coloração diferencial de Gram, isolamento indireto por meio de plântulas e teste sorológico da imunofluorescência, sendo os dois últimos eficientes para detecção em semente. Diatloff et al. (1993) concluíram que o teste de imunofluorescência com anticorpos monoclonais e um meio semi-seletivo para Cff, detectou mais sementes infectadas que os métodos de observação de sintomas foliares e corrida bacteriana, inclusive detectando o patógeno em plantas assintomáticas.

A microscopia eletrônica também pode ser usada para a detecção do patógeno, bem como para estudar suas características morfológicas e sua movimentação no sistema vascular da planta (Dinesen, 1978; Johnson et al., 1982).

A caracterização da bactéria pode ser feita por meio de testes morfológicos e bioquímicos/fisiológicos, tais como: morfologia celular, coloração diferencial de Gram, solubilidade em hidróxido de potássio a 3%, oxidação/fermentação da glicose, redução de nitrato, urease, produção de indol, produção de gás sulfídrico de cisteína, podridão de discos de batata, catalase, tirosinase, vermelho de metila, tolerância a cloreto de sódio a 7% e a 9%, oxidase e produção de ácidos a partir de adonitol, amido, inositol, glicerol, glicose, melizitose, maltose e sacarose (Bradbury, 1986).

O método de inoculação da bactéria mais recomendado é a punção, com agulha entomológica mergulhada em colônia bacteriana, no pecíolo ou caule abaixo da folha primária (Hedges, 1926). Dinesen (1978) relata que após a inoculação no caule, 2 cm abaixo dos cotilédones da planta de feijão, a bactéria se multiplicou na medula e penetrou nas células

mais velhas do xilema primário, de onde se propagou ascendentemente, sendo encontrada nas brotações mais jovens após 72-96 horas.

Rickard & Walker (1965) testaram vários métodos de inoculação de Cff. A inoculação no nó cotiledonar, por punção de agulha infestada, foi o método mais eficiente nas duas épocas avaliadas, aos 12 e 26 dias após o transplante. A inoculação por imersão em inóculo por 20 segundos, da folha primária com injúrias, foi quase tão eficiente quanto a punção aos 12 dias, mas bem inferior aos 26 dias. As inoculações de folhas sob pressão e por rega do inóculo, após ferimentos nas raízes, não foram eficientes em nenhuma das épocas.

Como medidas de controle da doença deve-se utilizar sementes livres do patógeno, rotação de cultura com pelo menos dois anos entre os cultivos de feijoeiro e eliminar plantas que possam ser hospedeiras do patógeno (Saettler, 1991). A introdução de cultivares resistentes ou tolerantes, combinada com esses manejos, é citada na literatura internacional, em programas de melhoramento que visam reduzir a incidência de doenças bacterianas na cultura. A cultivar americana “Great Northern” (GN) e a linhagem PI 165078 são os principais materiais tolerantes/resistentes utilizados nestes programas (Coyne & Schuster, 1974; Nikitina et al., 1982; Trepczynska, 1983).

Coyne & Schuster (1971) obtiveram a cultivar “GN Emerson”, com alta tolerância a isolados de Cff. Esta cultivar foi derivada da seleção por “pedigree” do cruzamento entre GN 1140 e PI 165078. Coyne & Schuster (1976) lançaram a cultivar “Great Northern Star”, que foi a primeira variedade a apresentar resistência conjunta ao crestamento e à murcha bacteriana.

Nikitina et al. (1980) avaliaram o comportamento de 65 cultivares de feijoeiro a murcha bacteriana. Destas, 10 foram consideradas resistentes, incluindo “GN 123”, “Pearlgreen”, “Sanocrop”, “Maxidor” e “Romulus”.

Em relação ao comportamento de cultivares resistentes a essa doença, no Brasil, Maringoni (2000) avaliou 40 cultivares de feijoeiro, através da inoculação de dois isolados de Cff e constatou níveis razoáveis de resistência nas cultivares IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Aruã e IAC Carioca Pyatã.

Estudos sobre a associação entre a resistência à murcha bacteriana e a fixação simbiótica do nitrogênio em alfafa sugerem que a inoculação com *Rhizobium melilotis* promoveu uma melhor resistência do hospedeiro à infecção por *C. flaccumfaciens* pv. *insidiosum*, pela interação entre as duas bactérias (Bordeleau & Michaud, 1981), sendo esta uma outra alternativa que poderia ser utilizada dentro de um sistema de manejo integrado de doenças.

2.2 Controle biológico de doenças

As práticas utilizadas para se realizar o controle biológico podem incluir manejos culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira; melhoramento da planta para aumentar resistência ou adequar o hospedeiro para as atividades antagônicas de microrganismos; introdução em massa de antagonistas, isolados não-patogênicos ou outros agentes benéficos (Bettiol & Ghini, 1995). A presente revisão irá se restringir a descrição da utilização de isolados fúngicos no controle de doenças.

O controle de doenças incitadas por bactérias, por meio de métodos biológicos se reveste de grande importância, mesmo sendo as fitobactérias de difícil controle, e com praticamente todas as medidas disponíveis atualmente serem de exclusão, muito pouco podendo-se fazer após a doença se estabelecer em condições de campo (Romeiro, 1995).

A formação de coleções de microrganismos antagônicos selecionados, permitindo um maior intercâmbio entre instituições, é

importante para se conseguir novos e rápidos avanços e ainda reduzir os custos de produção.

Na interação entre os patógenos causadores de murcha, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (= *Corynebacterium insidiosum*) e *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, em plantas de alfafa em condições de campo, foi constatado menor severidade dos sintomas da murcha bacteriana em plantas inoculadas com a mistura dos dois patógenos, do que em plantas inoculadas com a bactéria isoladamente. *F. oxysporum* aparentemente produziu uma substância que inibiu *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* (Frosheiser & Barnes, 1978; Johnson et al., 1982). Em feijoeiro, Maringoni (1997)* isolou Cff e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* de uma mesma planta, sugerindo que possa haver, a exemplo da cultura da alfafa, alguma interação entre os patógenos, com reflexo na severidade dos sintomas das doenças.

Diversos trabalhos têm demonstrado a potencialidade dos fungos do gênero *Fusarium* para atuarem como agentes antagônicos a patógenos fúngicos e bacterianos.

A utilização de isolados não-patogênicos de *F. oxysporum* no controle de isolados patogênicos, tem sido frequentemente testada em diversas interações. Um exemplo disto é o trabalho de Mandeel & Baker (1991), que obtiveram declínio na incidência da murcha-de-Fusarium do pepino, causada por *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, através da infestação do solo com isolados de *F. oxysporum*. Os autores sugerem que os mecanismos de supressão da murcha, por estes agentes não-patogênicos, envolvem competição na rizosfera e em sítios de infecção, bem como a indução de resistência no hospedeiro.

Baker et al. (1990), estudando a atividade antimicrobiana de compostos de naftoquinonas, obtidos ou derivados sinteticamente de extratos de culturas de *F. solani* e *F. oxysporum*,

* MARINGONI, A. C. (Dept. Produção Vegetal, FCA, UNESP, Botucatu, SP). Comunicação pessoal, 1997.

detectaram uma inibição de *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* por 6 dos 11 compostos avaliados.

Tezuka & Makino (1991), visando o controle biológico da murcha-de-Fusarium do morangueiro, causada por *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, inocularam plantas com isolados não-patogênicos de *F. oxysporum*, com posterior inoculação do patógeno. O número de plantas doentes foi significativamente reduzido pelas inoculações dos agentes de controle.

Em outro teste, utilizando 8 isolados de fungos da filosfera de plantas de sorgo, Shree & Hareesha (1988) constataram que 3 isolados (*Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata* e *F. moniliforme*) causaram significativa inibição da germinação e redução na porcentagem de infecção de *Exserohilum turcicum*, agente causal da helmintosporiose.

Deb & Dutta (1991) isolaram diversas espécies de fungos da rizosfera de plantas de soja, cultivadas em solo infestado com *Sclerotium rolfsii*, agente causal do tombamento ou murcha-de-Sclerotium. Em teste *in vitro*, um isolado de *Trichoderma viride* e outro de *F. solani*, mostraram zonas de inibição ao crescimento do patógeno, enquanto outras espécies, como *Aspergillus flavus*, inibiram o patógeno por apresentarem crescimento mais rápido.

Yamaguchi et al. (1992) testaram o isolado de *F. oxysporum* MT0062, proveniente de raízes de tomateiro, no controle de diversas doenças de solanáceas. O isolado mostrou supressividade às murchas em tomateiro, causadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Verticillium dahliae*, e proteção contra infecção de *Fusarium* e *Verticillium* na cultura da beringela. Além disto, plântulas de tomateiro cultivadas em solo infestado com o isolado MT0062, mostraram reduzido desenvolvimento de requeima (*Phytophthora infestans*), quando inoculadas, posteriormente, na parte aérea. Com isso, os autores sugerem que *F. oxysporum* MT0062 pode infectar cultivos de solanáceas sucessivamente, mas assintomaticamente, induzindo uma resistência sistêmica não-específica.

A indução de resistência, assunto a ser abordado a seguir, pode ser considerada uma técnica de controle biológico de doenças, se levar em consideração que o controle da doença é realizado pela própria planta, através de seu arsenal bioquímico natural, apenas sendo este previamente ativado pelo indutor.

2.3 Indução de resistência

O fenômeno denominado de resistência sistêmica adquirida (“systemic acquired resistance” ou SAR) tem sido objeto de diversas revisões. A primeira caracterização em detalhes da ocorrência de SAR foi feita por Ross (1961). Este autor estudou o fenômeno em plantas de fumo, que exibiram lesões locais quando infectadas pelo vírus do mosaico do fumo (TMV). Essas lesões foram restringidas no seu desenvolvimento, por uma inoculação prévia com o mesmo vírus, sendo que esta restrição não ocorreu só com o TMV, mas também com outros patógenos incluindo vírus, bactérias e fungos.

A resposta de SAR pode ser iniciada após a infecção por patógenos que causam necroses, por extratos microbianos, por tratamentos químicos, ou ainda pela colonização da rizosfera da planta por rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR). Esses agentes levam as plantas a produzirem “sinais” que são transportados por toda a planta e induzem a síntese de ácido salicílico (AS) que, por sua vez aciona a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) em folhas não infectadas, desencadeando a resposta de SAR que promove uma proteção duradoura contra uma gama de fitopatógenos. Plantas que não acumulam AS não são capazes de induzir SAR biologicamente (Görlach et al., 1996; Pieterse et al., 1996).

A utilização desses mecanismos endógenos de defesa das plantas para o controle de doenças é uma alternativa ao uso de

defensivos químicos convencionais. A quase totalidade dos produtos disponíveis atualmente possuem atividade antibiótica direta (Knight et al., 1997). Grande parte das pesquisas mais recentes na área de indução de resistência, tem se centralizado na síntese de produtos químicos com ação análoga ao do AS, denominados ativadores de plantas ou indutores de resistência. Esses produtos devem preencher três critérios para serem classificados como um verdadeiro indutor de resistência: 1) plantas tratadas quimicamente defendem-se contra o mesmo espectro de patógenos do que aquelas ativadas biologicamente; 2) o produto e seus metabólitos não devem apresentar atividade direta contra os patógenos; 3) os processos bioquímicos induzidos pelo produto devem ser os mesmos do que aqueles induzidos biologicamente (Kessmann et al., 1994).

Um análogo do AS, o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA) foi o primeiro composto sintético a ativar SAR. Entretanto, tanto AS como INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e portanto não possuem potencial de uso comercial como protetores de plantas. Recentemente, outro análogo de AS, o benzothiadiazole (BTH), foi demonstrado ser um potente ativador de SAR, principalmente se comparado ao AS e ao INA, possibilitando a proteção em condições de campo contra um amplo espectro de patógenos em diversas culturas (Görlach et al., 1996).

Registrado na Alemanha, em 1996, o produto da classe química benzothiadiazole, com nome químico de benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (BTH) e nome comum proposto de acibenzolar-S-methyl (CGA 245.704), tem satisfeito a todos os critérios de um ativador de plantas, induzindo SAR mesmo em plantas que não são capazes de produzir AS. O produto foi usado em baixas concentrações (menos do que 50 g i.a./ha) e deve ser aplicado preventivamente, antes do início da infecção (Knight et al., 1997).

Atualmente, com intuito de avaliar e registrar produtos para diversas culturas, estão sendo realizadas pesquisas em vários países.

Siegrist et al. (1997) utilizando o ativador de plantas Bion R, cujo ingrediente ativo é o BTH, induziu SAR em feijoeiro da cultivar Dufrix contra diferentes patógenos fúngicos e bacterianos de importância agrícola. Para tal, folhas de feijoeiro foram pulverizadas com BTH ou por um novo método de aplicação desenvolvido, que consistiu na germinação das sementes em solução do indutor. Um período mínimo de 4 dias foi necessário para obter resistência a *Uromyces appendiculatus*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Não se constatou indução de resistência a *P. savastoni* pv. *phaseolicola*.

Considerando que o controle de doenças em plântulas durante a emergência é uma das prioridades de muitos sistemas de cultivo, Jensen et al. (1998) testaram acibenzolar-S-methyl no tratamento de sementes de duas espécies de brássicas, contra os patógenos *Peronospora parasitica* e *R. solani*. Para isto, embebeu as sementes com várias concentrações do produto e obteve uma significativa redução na intensidade de esporulação de *P. parasitica* e redução no tombamento causado por *R. solani*, com os efeitos variando de acordo com as concentrações dos tratamentos.

Lustosa et al. (1999) em experimento para avaliar a toxidez de BTH, tratou sementes de tomateiro (Santa Cruz 'Kada') por imersão em soluções a diferentes concentrações (50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL) de BTH, colocando-as para germinar pelo método padrão. Cinco e 10 dias após o tratamento, procedeu-se a avaliação, observando-se um melhor percentual de germinação das sementes não tratadas (94 %); as concentrações 50, 100 e 250 µg/mL resultaram, respectivamente, em germinações de 82, 77,5 e 54 %. Nas demais concentrações, o percentual foi inferior a 5 %. Considerando a potencialidade de BTH como ativador de defesas de plantas, os autores relatam a importância de investigar se a exposição de sementes a baixas concentrações do produto pode ativar

mecanismos de defesa ainda no embrião, perdurando o suficiente para proteger a plântula contra patógenos.

Buscando avaliar o potencial de BTH para conferir resistência de tomateiro ao patógeno de solo *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, Benhamou & Belanger (1998a) realizaram pulverizações foliares do produto. Enquanto nas plantas não tratadas houve uma intensa colonização dos tecidos radiculares pelo fungo, nas tratadas o crescimento do patógeno ficou restrito à epiderme, devido à formação de caloses e agregações citoplasmáticas. Com isto evidenciou-se que a aplicação de BTH induziu o tomateiro suscetível a reagir mais rapidamente e com maior eficiência ao ataque do fungo. Em outro experimento, os mesmos autores testaram o BTH, via pulverizações foliares, em pepino para induzir resistência contra *Pythium ultimum*, e evidenciaram resultados semelhantes aos do experimento anterior com tomateiro (Benhamou & Belanger, 1998b)

Romeiro et al. (1999) avaliaram o efeito fitotóxico e a ação de BTH em plantas de feijoeiro e no controle do crestamento bacteriano comum. Concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 µg/mL foram pulverizadas 15 dias após a emergência e a inoculação com a bactéria foi efetuada 7 dias após. A concentração de 100 µg/mL mostrou-se eficiente no controle da bacteriose e causou pouca fitotoxidez.

Em outro experimento, Jesus Júnior et al. (1999) avaliaram a ação de BTH contra o fungo *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal da mancha angular do feijoeiro, e a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano do feijoeiro. Para o teste com o fungo, plântulas foram pulverizadas com solução aquosa do ativador na concentração de 100 µg/mL, 15 dias após a germinação e inoculadas, após 7 dias, com conídios do fungo. A bactéria foi inoculada com suspensão de células na fase exponencial de crescimento, por seccionamento do limbo foliar. As avaliações de severidade, empregando-se uma escala diagramática

para cada caso, mostraram uma redução de aproximadamente 50 % para mancha angular e de 37,2 % para o crestamento bacteriano.

Na indução de proteção a bactérias, um dos fatores mais importantes para o seu sucesso é a determinação do intervalo de tempo mais adequado entre a aplicação do indutor e a inoculação, permitindo que a planta tenha tempo de ativar seus diferentes mecanismos de defesa e resposta. Entre esses mecanismos se encontram o bloqueamento dos sítios de recepção e interação entre bactéria e as células estimuladas do hospedeiro e a resposta bioquímica de uma atividade celular estimulada, como resposta de resistência estimulada pelo agente indutor (Moraes, 1991).

Muitos trabalhos, com diferentes patógenos, têm sugerido que o aumento da atividade de enzimas oxidativas, seguindo a interação patógeno-hospedeiro, resulta em indução não-específica de resistência na planta.

O modo de ação, ao nível bioquímico dos produtos descritos como indutores de resistência, tem sido focado em estudos recentes. A indução pode ocorrer pela ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese e enzimas envolvidas na síntese de lignina e fitoalexinas, como peroxidases e polifenoloxidasas (Resende et al., 2000).

As peroxidases e polifenoloxidasas são enzimas encontradas em todas as plantas, em muitos fungos e bactérias aeróbicas. Frequentemente, aumentam sua atividade em resposta ao estresse e um de seus principais papéis parece ser o de promover a proteção à célula (Siegel, 1993). Também podem participar de outras reações oxidativas em frutos e hortaliças, tais como mudança de cor, degradação de clorofila ou auxinas, oxidação de fenóis, oxidação do ácido indol acético e biossíntese de lignina (Clemente & Pastore, 1998). Segundo Edreva (1989), o acúmulo de metabólitos oxidados por enzimas e a formação de espécies ativas de

oxigênio, que são prejudiciais às células do hospedeiro, poderiam contribuir com o dano causado por um patógeno, bem como servir como agentes antimicrobianos.

Em relação à ação do ativador de plantas, especificamente na indução de resistência à murcha-de-*Curtobacterium*, a presente revisão bibliográfica não encontrou trabalhos relatados sobre o assunto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Fusarium* spp.

Os procedimentos para isolar os patógenos foram feitos a partir da coleta de plantas com os sintomas da murcha-de-*Curtobacterium*, em lavouras de regiões produtoras. Foram coletadas amostras de plantas de feijoeiro com sintomas de murcha e morte súbita, em lavouras do município de Coronel Macedo - SP, procedendo-se as metodologias para isolamento de bactérias e fungos, descritas nos itens 3.1.1 e 3.1.2. Foram coletadas plantas com 20 a 30 dias de idade, das cultivares Pérola, Carioca e Campeão 3. As plantas foram analisadas individualmente para se verificar a presença de Cff e de *Fusarium* spp. Também foram utilizados isolados de Cff e de *Fusarium* spp. pertencentes à coleção de culturas de fitopatógenos da Área de Fitopatologia, do Departamento de Produção Vegetal, FCA/UNESP – Campus de Botucatu.

3.1.1 Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

O isolamento da bactéria foi feito a partir de fragmentos de pecíolos das folhas, de plantas com sintomas da doença, desinfestados em álcool a 70%, por 30 segundos, e em hipoclorito de sódio a 1,5%, por 1 minuto, enxaguados e triturados em água destilada e esterilizada. A suspensão obtida foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura nutriente-sacarose-ágar (NSA) (3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 15,0 g de ágar, 5,0 g de sacarose, 1,0 L de água destilada), na forma de estrias. As placas contendo suspensões bacterianas foram incubadas a 28°C,

por 3 dias. As colônias bacterianas formadas na superfície do meio de cultura foram analisadas quanto ao seu formato, coloração, brilho e característica de crescimento. As que apresentaram as características do gênero *Curtobacterium* foram purificadas, através de novo plaqueamento em estrias, incubadas e, posteriormente, transferiu-se uma colônia, para tubos de ensaio com meio NSA. Após o crescimento bacteriano na superfície do meio de cultura, foi colocado óleo mineral “Nujol” esterilizado, sendo catalogados e armazenados sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) para uso posterior.

Para os testes de patogenicidade utilizaram-se plantas da cultivar IAC Carioca com 10 dias de idade, cultivadas em vasos com 4 plantas e com areia grossa autoclavada, sob condições de casa-de-vegetação. As bactérias foram cultivadas em meio NSA em tubos, de forma inclinada, durante 48 horas a 28°C . A inoculação foi feita pela punção de uma agulha entomológica esterilizada e mergulhada nas colônias bacterianas, em 2 pontos do caule da planta, abaixo das folhas primárias (Maringoni, 2000). A testemunha foi representada por plantas com punção de agulha mergulhada em água destilada esterilizada. A irrigação foi feita semanalmente com solução nutritiva de Sarruge (1975) e diariamente com água, conforme o necessário. As plantas foram observadas até a manifestação de sintomas da doença, realizando-se então o reisolamento do patógeno, através dos métodos descritos anteriormente.

3.1.2 Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp.

O isolamento de fungos do gênero *Fusarium* foi realizado, à partir de fragmentos de tecido retirados da região vascular, acima do colo e abaixo do primeiro nó de plantas de feijoeiro com sintomas de murcha, desinfestados em álcool a 70%, por 1 minuto, em hipoclorito de sódio a 1,5%, por 2 minutos, e lavados em água destilada esterilizada, e

colocados em placas de Petri com meio de cultura maltose-peptona-ágar (MPA) (4,0 g de maltose, 1,0 g de peptona, 14,0 g de ágar, 1,0 L de água destilada) + oxitetraciclina (0,06 g de oxitetraciclina, adicionado ao meio de cultura a ± 50 °C, após autoclavagem). A incubação foi feita a temperatura de 25-28°C, sob luz contínua com lâmpadas fluorescentes “luz do dia”; entre 5 a 7 dias. Após o desenvolvimento, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio com meio MPA, visando a purificação e identificação do fungo pela observação das características de crescimento e de estruturas de reprodução (hifas e conídios) em microscópio ótico (Booth, 1971).

Para armazenamento, os fungos foram repicados para tubos de ensaio com meio batata-dextrose-ágar (BDA) (água de cocção de 200 g de batata, 20,0 g de dextrose, 1,0 L de água destilada), onde após o desenvolvimento da colônia foi colocado óleo mineral “Nujol” esterilizado, armazenando-se sob refrigeração (4 ± 1 °C) para uso posterior. Também foram utilizados os métodos de preservação em água descrito por Castellani (1967) e preservação em solo, considerados mais adequados que o armazenamento em óleo, onde pode ocorrer alteração na patogenicidade do fungo (Booth, 1971).

Os fungos identificados do gênero *Fusarium* foram submetidos aos testes de patogenicidade, utilizando-se plantas de feijoeiro da cultivar IAC Carioca com 8 dias de idade, obtidas em sementeiras constituídas de bandejas plásticas com substrato de areia grossa autoclavada, sob condições de casa-de-vegetação. Os isolados para inoculação foram cultivados em placas de Petri com meio de feijão-ágar modificado (Nascimento, 1992) e incubados a 25-28°C, sob iluminação contínua, por 7 dias, até o crescimento e esporulação da colônia. Transcorrido este período, foi adicionado 10 mL de água destilada esterilizada, contendo 0,01% de Tween 20, a cada placa de Petri e, com auxílio de um pincel de cerdas finas, os conídios e fragmentos de micélio

foram suspensos. Estas suspensões foram filtradas em camada dupla de gaze, determinando-se as concentrações de macroconídios da suspensão resultante com o auxílio de hemacitômetro, ajustando para 10^6 macroconídios/mL (Ribeiro & Hagedorn, 1979; Johnson et al., 1982; Balardin et al., 1990; Nascimento, 1992).

A inoculação foi feita retirando-se as plantas da sementeira, lavando-se o sistema radicular para remoção da areia aderida, cortando-o em 1/3 do seu comprimento e mergulhando-o na suspensão do inóculo, durante 10 minutos, conforme Costa et al. (1989). Após, as plantas foram transplantadas para vasos plásticos contendo areia lavada e autoclavada, permanecendo em condições de casa-de-vegetação. A irrigação foi feita semanalmente com solução nutritiva de Sarrouge e diariamente com água, conforme fosse necessário. As plantas foram observadas até a manifestação de sintomas da doença, realizando-se então o reisolamento do patógeno através dos métodos descritos anteriormente.

3.2 Estudo *in vitro* da produção de substâncias por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, inibitórias a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Para este experimento foi utilizada metodologia adaptada de Johnson et al. (1982). Os isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Feij 2626 e Feij 2627), selecionados no teste de patogenicidade, foram empregados.

Discos de NSA com 0,5 cm de diâmetro, com micélio dos fungos, foram repicados para o centro de placas de Petri contendo meio de cultura NSA e ao redor destes foram depositados discos de papel-de-filtro esterilizados, de 1,3 cm de diâmetro. Após esta operação as placas foram incubadas durante sete dias, a 28°C, na ausência de luz. Seguida a incubação, os discos de papel-de-filtro contendo crescimento fúngico,

foram retirados das placas e transferidos para placas de Petri esterilizadas e colocados em dessecador, contendo um recipiente com 20 mL de clorofórmio, e então este foi tampado, permanecendo assim por um período aproximado de 12 horas, em condições de laboratório. Esta operação foi feita visando inativar o fungo que se desenvolveu sobre os discos de papel-de-filtro. Discos de papel-de-filtro esterilizados, sem crescimento fúngico, foram também submetidos ao tratamento com clorofórmio e serviram de controle.

Os isolados Feij 2716, Feij 2718, Feij 2719, Feij 2720 e Feij 2721 de Cff, selecionados no teste de patogenicidade, foram previamente cultivados em 50 mL de nutriente líquido, durante 48 horas, a 28°C. Seguida a incubação, os isolados foram transferidos para recipientes contendo meio de cultura NSA fundente, a 45-50°C, na proporção de 1 parte de suspensão bacteriana para 9 partes de meio de cultura.

Essa mistura foi transferida para placas de Petri (20 mL), deixando-a solidificar sob condições ambientes. Após a solidificação do meio de cultura, foi colocado no centro de cada placa, um disco de papel-de-filtro contendo crescimento fúngico inativado ou disco de papel-de-filtro sem crescimento fúngico. Após essa operação, as placas foram submetidas à refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) por 1 hora e 30 minutos, visando a difusão dos metabólitos fúngicos contidos no disco de papel-de-filtro para o meio de cultura.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2 x 5, sendo dois isolados de fungo e 5 isolados de bactéria. Foram feitas cinco repetições, sendo cada uma delas representadas por uma placa de Petri.

As placas foram incubadas a 28°C, durante 48 horas, e em seguida aferidos, em mm, os diâmetros perpendiculares dos halos de inibição formados.

3.3 Estudo *in vitro* da produção de substâncias por isolados não-patogênicos de *Fusarium* spp., inibitórias a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Este ensaio foi conduzido de forma semelhante ao descrito no item 3.2. Foram empregados os isolados de *Fusarium* spp. (Feij 2706, Feij 2707 e Feij 2708), selecionados como não-patogênicos no teste de patogenicidade e os isolados Feij 2716 e Feij 2720, de Cff.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 x 2, sendo três isolados de fungo e dois isolados de bactéria. Foram feitas cinco repetições, sendo cada uma delas representada por uma placa de Petri.

3.4 Estudo da produção de substâncias *in vitro* por isolados de *Fusarium* spp., extraídas por filtragem, inibitórias a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

3.4.1 Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sob agitação

Este experimento diferenciou-se dos anteriores na metodologia utilizada para se obter os metabólitos fúngicos a serem testados na inibição dos isolados de Cff. Foram utilizados dois isolados patogênicos de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Feij 2626 e Feij 2627) e isolados não-patogênicos de *Fusarium* spp. (Feij 2706, Feij 2707 e Feij 2708).

Os isolados fúngicos foram cultivados através da transferência de um disco de meio de cultura colonizado, em um erlenmeyer com 250 mL de meio líquido NS (3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 5,0 g de sacarose, 1,0 L de água destilada). Os erlenmeyers foram colocados em um agitador de bancada, sob temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), por dez dias. Após este período, as soluções formadas foram coadas em

dupla camada de gaze, centrifugadas 8.000 g, durante 20 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram filtrados em filtro bacteriológico. Obtiveram-se cerca de 30 mL de extrato de cada isolado, de onde retiraram-se 15 mL de cada um para serem autoclavados a 120°C, por 30 minutos.

Os isolados Feij 2716 e Feij 2720 de Cff foram previamente cultivados em 50 mL de nutriente líquido, durante 48 horas, a 28°C. Após a incubação, os isolados foram transferidos individualmente para recipientes contendo meio de cultura NSA fundente, a 45-50°C, na proporção de 1 parte de suspensão bacteriana para 9 partes de meio de cultura. Essa mistura foi transferida para placas de Petri (20 mL), deixando-a solidificar sob condições ambiente. Após a solidificação do meio de cultura, foi colocado no centro de cada placa um disco de papel-de-filtro esterilizado, de 1,3 cm de diâmetro, onde pingou-se 30 µl de cada extrato obtido dos isolados fúngicos, autoclavado ou não.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado, no esquema fatorial 5 x 2, sendo cinco isolados de fungo e 2 isolados de bactéria. Foram feitas cinco repetições, sendo cada uma delas representada por uma placa de Petri.

Após essa operação, as placas foram submetidas à refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) por 1 hora e 30 minutos, visando a difusão dos metabólitos fúngicos pingados no disco de papel-de-filtro para o meio de cultura. A seguir as placas foram incubadas a 28°C, durante 48 horas, e em seguida aferidos em milímetros os diâmetros perpendiculares dos halos de inibição formados.

3.4.2 Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sem agitação

Este experimento consistiu na repetição dos procedimentos descritos no item 3.4.1, com o mesmos isolados fúngicos e bacterianos, modificando-se apenas o método de cultivo dos fungos, pois os

isolados foram incubados sem agitação, em estufa a 28°C, no escuro, por 10 dias.

3.5 Avaliação de isolados não-patogênicos de *Fusarium* spp. no controle da murcha-de-Curtobacterium em feijoeiro, sob condições de casa-de-vegetação

Dois isolados de *Fusarium* spp. não-patogênicos (Feij 2706 e Feij 2707) foram avaliados quanto ao seu efeito em relação a um isolado patogênico de Cff, que foi inoculado em plantas de feijoeiro cultivadas em vasos, sob condições de casa-de-vegetação. Para a produção de inóculo, os isolados preservados em tubo de cultura contendo substrato autoclavado composto de esterco de curral + areia lavada + farelo de aveia, foram repicados para placas de Petri com meio de cultura feijão-ágar e cultivados durante 4 dias a 26°C, sob luz contínua. Transcorrido este período, 2 discos de 6 mm de diâmetro foram retirados das margens das colônias e transferidos para erlenmeyers contendo 500 mL de meio de Armstrong (Tuite,1969), sendo estes mantidos em agitador de bancada durante 7 dias a temperatura de 26±2°C. A padronização do inóculo, após o crescimento do fungo, foi feita homogeneizando os isolados por 30 segundos, com auxílio de liquidificador previamente desinfestado em álcool a 70%, depois em hipoclorito de sódio a 2% e enxaguado em água de torneira a cada isolado, em seguida, foram feitas as diluições de 1:10, 1:50, 1:100 e 1:500 (v/v) em água destilada. Como testemunha foi utilizado o meio de Armstrong sem o cultivo do fungo.

Para a obtenção das plântulas, sementes da cultivar IAC Carioca tratadas com hipoclorito de sódio a 2%, por 5 minutos, lavadas em água corrente e colocadas para germinar em papel toalha umedecido, durante 4 dias, a 25-28°C.

A infestação do substrato com os isolados fúngicos foi feita vertendo-se 200 mL das diluições em vasos contendo substrato autoclavado constituído de 70% de areia grossa, 15% de terra e 15% de esterco de curral curtido, transplantando-se, em seguida, as plântulas de feijoeiro. A inoculação do isolado bacteriano (Feij 2721) foi feita 8 dias após o transplante das plântulas, através da punção com agulha, mergulhada em colônia bacteriana do isolado, em dois pontos do caule, entre o nó cotiledonar e o primeiro par de folhas.

A avaliação dos sintomas da murcha-de-*Curtobacterium* foi realizada 15, 20 e 25 dias após a inoculação, atribuindo-se notas de 1 a 9, conforme escala diagramática para a murcha-de-*Fusarium* (Vanschoonhoven & Pastor-Corrales, 1987), onde: 1 = sem sintomas visíveis; 3 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% das folhas da planta); 5 = aproximadamente 25% de folhas apresentam murchas e amarelecimento; 7 = aproximadamente 50% de folhas murchas, amarelecimento e necrose de folíolos, plantas com nanismo; 9 = aproximadamente 75% ou mais de folhas com murcha e/ou necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e ou morte da planta.

O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso com 9 tratamentos e 4 repetições, sendo cada parcela representada por um vaso com 3 plantas.

3.6 Avaliação *in vitro* da ação de acibenzolar-S-methyl sobre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Visando verificar a ação *in vitro* do ativador de plantas sobre a bactéria, cinco isolados de Cff (Feij 2716, Feij 2718, Feij 2625, Feij 2626 e Feij 2634), foram previamente cultivados em 50 mL de nutriente líquido, durante 48 horas, a 28°C. Seguida a incubação, os isolados foram transferidos individualmente para recipientes contendo meio de cultura NSA

fundente, a 45-50°C, na proporção de 1 parte de suspensão bacteriana para 9 partes de meio de cultura. Essa mistura foi transferida para placas de Petri (20 mL), deixando-a solidificar sob condições ambientes. Após a solidificação do meio de cultura, foi colocado no centro de cada placa um disco de papel-de-filtro esterilizado, de 1,3 cm de diâmetro, e pingado sobre este 30 µl da solução aquosa de acibenzolar-S-methyl nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL. A utilização de água destilada e esterilizada serviu de testemunha.

Após essa operação, as placas foram submetidas à refrigeração ($\pm 5^\circ\text{C}$) por 1 hora e 30 minutos, visando a difusão do produto químico contido no disco de papel-de-filtro para o meio de cultura.

As placas foram incubadas a 28°C, durante 48 horas, e em seguida aferidos em milímetros os diâmetros perpendiculares dos halos de inibição formados ao redor dos discos.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada uma delas representadas por uma placa de Petri. Empregou-se o delineamento fatorial 5 x 5 (4 concentrações mais a testemunha x 5 isolados de bactéria).

3.7 Avaliação da ação de acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e vigor de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium

Esta avaliação foi dividida em vários ensaios onde se buscou verificar o efeito do ativador de plantas sobre a germinação e o vigor de sementes de feijoeiro e sua eficiência na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.

3.7.1 Tratamento de sementes de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl

3.7.1.1 Avaliação da germinação

Este ensaio verificou o efeito do tratamento de sementes com acibenzolar-S-methyl sobre a germinação de sementes. Para isso, 200 g de sementes para cada tratamento, da cultivar IAC Carioca, foram tratadas em recipiente plástico onde foi colocado 1 % de água, e, após agitação, adicionou-se os produtos, na sua formulação de grânulos molháveis, agitando-se novamente até perfeita cobertura das sementes. Foram usadas as seguintes dosagens: 25, 50 e 75 g i.a./100 Kg de sementes e a testemunha só com água. Em seguida, 200 sementes (4 repetições de 50) de cada tratamento foram colocadas para germinar em rolos de papel-de-filtro (papel “germ-test”) umedecidos (25 sementes/rolo), em estufa à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, e avaliadas 9 dias após incubação pela contagem de sementes que germinaram dando origem a plântulas normais.

3.7.1.2 Avaliação do vigor

As sementes foram tratadas com o indutor de resistência nas mesmas concentrações utilizadas no teste de germinação descrito no item 3.7.1.1 e foram semeadas em bandejas plásticas com substrato de areia grossa lavada e autoclavada, 50 sementes/bandeja. Foram feitas 4 repetições, totalizando 200 sementes/tratamento (4 bandejas) (Nakagawa, 1999)*. Foi avaliada a velocidade de emergência, pela contagem diária de plantas até a emergência de todas as sementes viáveis. O vigor foi avaliado pela análise da aparência das plantas (normal e anormal) até o estágio de início de emissão do primeiro par de trifólios.

* NAKAGAWA, J. (Dept. Produção Vegetal, FCA, UNESP, Botucatu, SP). Comunicação pessoal, 1999.

3.7.1.3 Avaliação da indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.

Sementes da cultivar IAC Carioca, tratadas pelo mesmo método e doses descritos no primeiro ensaio, foram semeadas em vasos contendo substrato autoclavado constituído de 70% de areia grossa, 15% de terra e 15% de esterco de curral curtido, sob condições de casa-de-vegetação. Foram semeadas 5 sementes/vaso e, após a germinação, selecionou-se as plantas com desenvolvimento normal, deixando-se 3 plantas/vaso.

O isolado bacteriano foi cultivado em placas de Petri com meio nutriente-sacarose-ágar (NSA) por 3 dias, a 25-28°C, e as colônias desenvolvidas na superfície foram utilizadas para inoculação das plântulas, 10 dias após a emergência, por meio de punção com agulha, mergulhada na colônia, em dois pontos na região do caule acima do nó cotiledonar e abaixo das folhas primárias (Maringoni, 2000).

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 4 repetições. As plantas foram irrigadas com água, 2 vezes ao dia, através de sistema de gotejamento automático, e semanalmente, com 50 mL/vaso de solução nutritiva de Sarruge (1975).

Os sintomas da doença foram avaliados aos 15, 20 e 25 dias após a inoculação, atribuindo-se notas que variam de 1 a 9, conforme escala para murcha-de-Fusarium (Vanschoonhoven & Pastor-Corrales, 1987).

3.7.2 Efeito da pulverização em plantas de feijoeiro com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl, na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium

Plantas de feijoeiro, da cultivar IAC Carioca, foram cultivadas em vaso, conforme descrito no item 3.5, sob condições de casa-de-vegetação. Cada parcela experimental foi representada por um vaso contendo 3 plantas. O indutor de resistência foi pulverizado nas folhas das plantas, aos 5 dias após o transplante, nas concentrações de 50, 100 e 250 $\mu\text{g i. a./mL}$. Para tal, utilizou-se um pulverizador costal da marca Brudden, modelo Super Spray, com 4 litros de capacidade e bico de pulverização do tipo cone vazio. Empregou-se ou não a inoculação das plantas com o isolado bacteriano. As plantas não inoculadas serviram como referência para se observar eventuais efeitos fitotóxicos do indutor de resistência sobre as plantas.

O isolado bacteriano empregado na inoculação (Feij 2634) foi cultivado por 3 dias em placas de Petri contendo meio NSA, a 25-28°C. As colônias desenvolvidas na superfície foram utilizadas para inoculação das plântulas, por meio de punção com agulha, mergulhada na colônia, em dois pontos na região do caule acima do nó cotiledonar e abaixo das folhas primárias (Maringoni, 2000). A inoculação da bactéria foi feita 5 dias após a pulverização com o indutor.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 5 repetições, tanto para as plantas inoculadas ou não com a bactéria. As plantas foram irrigadas diariamente com água e semanalmente com 50 mL/vaso de solução nutritiva descrita por Sarruge (1975).

Os sintomas da doença foram avaliados aos 15, 20 e 25 dias após a inoculação, atribuindo-se notas que variam de 1 a 9 (Vanschoonhoven & Pastor-Corrales, 1987). O peso seco da parte aérea das

plantas, após a secagem a 60°C, por 7 dias, foi avaliado nos tratamentos com e sem inoculação.

3.7.3 Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes da inoculação da bactéria

Neste ensaio, tanto os métodos para obtenção e cultivo das plantas, como a metodologia de produção, inoculação do isolado bacteriano e avaliação foram os mesmos utilizados no item 3.7.2. Os tratamentos com o ativador se diferenciaram quanto a época de pulverização, de acordo com o que segue:

- 1) pulverização 5 dias antes da inoculação;
- 2) pulverização 2 dias antes da inoculação;
- 3) pulverização no dia da inoculação;
- 4) pulverização de água em todas as épocas, c/ inoculação;
- 5) pulverização de água em todas as épocas, s/ inoculação.

O ativador foi aplicado na dosagem de 100 µg i.a./mL, baseado nos resultados do experimento do item 3.7.2, onde essa foi a maior dose aplicada que não causou fitotoxicidade às plantas.

O delineamento experimental e os métodos de avaliação foram os mesmos citados no item 3.7.2.

3.7.4 Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes e após a inoculação da bactéria

Neste ensaio, tanto os métodos para obtenção de plantas, como os métodos de produção, inoculação do isolado bacteriano e avaliação também foram os mesmos utilizados no item 3.7.2. Foi utilizada a época de pulverização 5 dias antes da inoculação. Os tratamentos com o

ativador se diferenciaram quanto a época de pulverização após a inoculação, de acordo com o que segue:

- 1) pulverização 5 dias antes;
- 2) pulverização 5 dias antes + 5 dias após inoculação;
- 3) pulverização 5 dias antes + 10 dias após inoculação;
- 4) pulverização 5 dias antes + 5 e 10 dias após inoculação;
- 5) pulverização 5 dias após inoculação;
- 6) pulverização 10 dias após inoculação;
- 7) pulverização 5 e 10 dias após inoculação;
- 8) pulverização de água em todas as épocas;
- 9) pulverização de água todas as épocas, s/ inoculação.

O ativador foi aplicado na dosagem de 100 µg i.a./mL. O delineamento experimental e os métodos de avaliação foram os mesmos citados no item 3.7.2.

3.7.5 Comparação da ação do acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, em cultivares de feijoeiro com diferentes níveis de resistência à doença

Neste ensaio, tanto os métodos para obtenção de plantas, como a metodologia de produção e inoculação do isolado bacteriano foram os mesmos dos ensaios anteriores. A diferença esteve na inclusão de mais duas cultivares de feijoeiro, IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã, que apresentam níveis de resistência à murcha-de-Curtobacterium (Maringoni, 2000). Foi utilizada a época de pulverização 5 dias antes da inoculação na dosagem de 100 µg i.a./mL. Os tratamentos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Tratamentos para avaliação do acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, em cultivares com diferentes níveis de resistência à doença.

Tratamento	Cultivar	Inoculação	Pulverização
1	IAC Carioca	Inoculado	não pulverizado
2	IAC Carioca	Inoculado	pulverizado
3	IAC Carioca	não inoculado	não pulverizado
4	IAC Carioca Akytã	inoculado	não pulverizado
5	IAC Carioca Akytã	inoculado	pulverizado
6	IAC Carioca Akytã	não inoculado	não pulverizado
7	IAC Carioca Pyatã	inoculado	não pulverizado
8	IAC Carioca Pyatã	inoculado	pulverizado
9	IAC Carioca Pyatã	não inoculado	não pulverizado

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 5 repetições.

Os sintomas da doença foram avaliados aos 15, 20 e 25 dias após a inoculação, atribuindo-se notas que variam de 0 a 9, conforme Maringoni (2000), onde: 0 = sem sintomas da doença; 1 = sintoma de mosaico nas folhas; 3 = poucas folhas murchas (1 a 3 folhas, menos de 10% das folhas da planta); 5 = aproximadamente 25% de folhas apresentam murchas e amarelecimento; 7 = aproximadamente 50% de folhas murchas, amarelecimento e necrose de folíolos, plantas com nanismo; 9 = aproximadamente 75% ou mais de folhas com murcha e/ou necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e ou morte da planta. As notas foram comparadas em relação às diferentes cultivares e em relação aos tratamentos com e sem pulverização, através de uma análise fatorial e teste de Tukey a 5% de significância. Foi aferido o peso seco da parte aérea das plantas, calculando-se a porcentagem de redução deste.

3.7.6 Análise da atividade de peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1) e nível de proteínas totais solúveis em três cultivares de feijoeiro pulverizadas com acibenzolar-S-methyl

Objetivando avaliar as prováveis modificações na atividade enzimática das plantas pulverizadas com o ativador de resistência, montou-se um ensaio com os tratamentos descritos no Quadro 2.

Os métodos para obtenção e cultivo das plantas em vasos está descrito no item 3.7.2. As plantas não foram inoculadas com Cff para que se pudesse avaliar apenas a ação do ativador de resistência, que foi aplicado na dosagem de 100 µg i.a./mL, 5 dias após a emergência.

Quadro 2 – Tratamentos para avaliação da atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e nível de proteínas totais solúveis.

Tratamento	Cultivar	Acibenzolar-S-methyl (100µg i.a. . mL ⁻¹)
1	IAC Carioca	não pulverizado
2	IAC Carioca	pulverizado
3	IAC Carioca Akytã	não pulverizado
4	IAC Carioca Akytã	pulverizado
5	IAC Carioca Pyatã	não pulverizado
6	IAC Carioca Pyatã	pulverizado

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições. Foram realizadas 4 coletas de material para análise, aos 5, 10, 15 e 20 dias após a pulverização com o indutor, e

consistiram no corte de pedaços do primeiro trifólio da planta e do caule na região entre o nó cotiledonar e a inserção do primeiro trifólio, obtendo-se portanto dois tipos de amostras distintas: folha e caule.

As amostras, após a pesagem, foram processadas para análise das atividades de peroxidases (POD), polifenoloxidasas (PFO) e nível de proteínas totais solúveis, através da sua trituração em 5 mL de tampão fosfato pH 6,7; 0,2 M, à temperatura entre 0-4°C. O homogeneizado formado foi centrifugado por 15 minutos a 8.000 g. O sobrenadante resultante foi armazenado em frascos de vidro para ser utilizado como extrato fonte de enzimas.

A atividade da peroxidase foi determinada pela reação dos extratos com as soluções A (20 mM de H₂O₂ + tampão fosfato 6,7) e B (4 mM de aminoantipirina em 10 mM de fenol) durante 5 minutos a 30°C, parando-se a reação com 2 mL de álcool etílico absoluto e fazendo-se a leitura, em espectrofotômetro, da absorbância (Å) a 505 nm (Lima, 1994). Após aplicação da fórmula descrita abaixo obteve-se a atividade de peroxidases para o respectivo peso da amostra, calculando-se em mM de H₂O₂/g de matéria fresca.

$$\text{Fórmula: } \mathbf{POD = (L \times V_t) / (6,68 \times T \times V_e)}$$

onde, POD = concentração de peroxidase

L = leitura da absorbância

V_t = volume total da amostra

T = tempo de reação

V_e = volume utilizado do extrato

A atividade de polifenoloxidasas foi determinada pelo mesmo método das peroxidases, mas sem a utilização da solução A na reação e leitura da absorbância a 420 nm (Kar & Mishra, 1976).

O nível de proteínas totais solúveis foi determinado pelo método de Bradford (1976), onde 0,1 mL do extrato foi colocado para reagir

com 5 mL do reativo de Bradford (100 µg de Brilhante Blue + 50 mL de etanol 95% + 100 mL H₃PO₄ 85% + água destilada q.s.p. 1L), por 5 minutos, e aferida a absorvância em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores das leituras foram substituídos na equação da reta pré-determinada (caseína como padrão) e expressos em µg de proteína/g de matéria fresca.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o cálculo das áreas abaixo da curva de produção dos compostos avaliados, em função do tempo (coletas) (Schneider et al., 1976), que foram submetidas a análise de variância no delineamento fatorial 3 x 2 (3 cultivares x com ou sem pulverização).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção e caracterização dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Fusarium* spp.

4.1.1 Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Foram obtidos seis isolados de Cff (Quadro 3) com as seguintes características: Gram positivas, apresentando bastonetes retos ou levemente curvados, na maioria individuais, mas com alguns arranjados em forma de V ou Y; superfície das colônias em meio nutriente-sacarose-ágar apresentou-se brilhante, circular, de bordo liso, sem viscosidade, semi-fluída, de coloração amarela-palha ou laranja-salmão.

Após teste de patogenicidade, o isolado Feij 2717 apresentou fraca patogenicidade, exibindo sintomas leves de amarelecimento e necrose de algumas folhas das plantas inoculadas.

Quadro 3 - Isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* obtidos de plantas de feijoeiro com sintomas de murcha.

Código do isolado	Cultivar	Coloração da colônia
Feij 2716	Pérola	Laranja-salmão
Feij 2717	Pérola	Amarela-palha
Feij 2718	Carioca	Amarela-palha
Feij 2719	Carioca	Amarela-palha
Feij 2720	Campeão 3	Amarela-palha
Feij 2721	Campeão 3	Amarela-palha

Os demais isolados mostraram-se igualmente patogênicos, causando inicialmente um amarelecimento nas folhas, constatado 18 dias após a inoculação, que evoluiu para manchas necróticas à partir dos 20 dias (Figura 1). Também observou-se um escurecimento externo dos pecíolos e uma perda de turgescência geral das plantas, distinguindo-as das plantas testemunhas que estavam com melhor desenvolvimento e folhas sem manchas.

No reisolamento foram obtidos isolados com as mesmas características dos isolados iniciais, confirmando a patogenicidade e identificados como Cff.

4.1.2 Isolamento, preservação e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp.

Foram obtidos três isolados puros de fungos do gênero *Fusarium*, a partir das mesmas plantas utilizadas para o isolamento das bactérias. Também foram utilizados dois isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Feij 2626 e Feij 2627), obtidos da coleção do Departamento de Defesa Fitossanitária que foram isolados de plantas de feijoeiro que estavam infectadas por Cff, provenientes de lavouras do município de Itapeva, SP (Quadro 4).



Figura 1 - Sintomas da murcha-de-Curtobacterium, em feijoeiro aos 20 dias após a inoculação.

Quadro 4 - Isolados de *Fusarium* spp. obtidos de plantas de feijoeiro com sintomas de murcha.

Isolado	Cultivar
Feij 2626 (<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>)	Carioca
Feij 2627 (<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i>)	Carioca
Feij 2706 (<i>Fusarium</i> sp.)	Campeão 3
Feij 2707 (<i>Fusarium</i> sp.)	Pérola
Feij 2708 (<i>Fusarium</i> sp.)	Pérola

No teste de patogenicidade, os isolados Feij 2706, Feij 2707 e Feij 2708 não foram patogênicos às plantas inoculadas, quando comparado com a testemunha não inoculada. Os isolados Feij 2626 e Feij 2627 confirmaram a patogenicidade ao feijoeiro, causando murcha nas plantas, a partir de 17 dias após a inoculação, que evoluiu para seca e morte de folhas e ponteiros. O sistema vascular das plantas mostrava escurecimento. O reisolamento dos fungos a partir das plantas com sintomas, resultou na obtenção de isolados com as mesmas características dos isolados iniciais, confirmando sua patogenicidade.

4.2 Estudo *in vitro* da produção de substâncias por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* inibitórias a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Os resultados referentes à produção de substâncias inibitórias *in vitro* por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* a isolados de Cff encontram-se relacionados no Quadro 5.

Quadro 5 - Diâmetro médio (mm) do halo de inibição formado por substâncias produzidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, em meio de cultura semeado com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Isolado Bacteriano	Isolado fúngico		Média
	Feij 2626	Feij 2627	
Feij 2716	5,10	8,60	6,85 ab*
Feij 2718	3,60	3,90	3,75 c
Feij 2719	4,00	6,20	5,10 bc
Feij 2720	6,60	9,60	8,10 a
Feij 2721	3,80	4,80	4,30 c
Média	4,62 B	6,62 A	

C.V.= 25,17%

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os isolados fúngicos produziram substâncias que levaram a formação de halos de inibição no crescimento bacteriano de todos os isolados de Cff testados (Figura 2).

O isolado Feij 2627 mostrou na média geral um maior halo de inibição que o isolado Feij 2626, indicando que o primeiro produziu substâncias mais tóxicas inibitórias às bactérias que o segundo, ou substâncias que se difundiram melhor no meio de cultura.

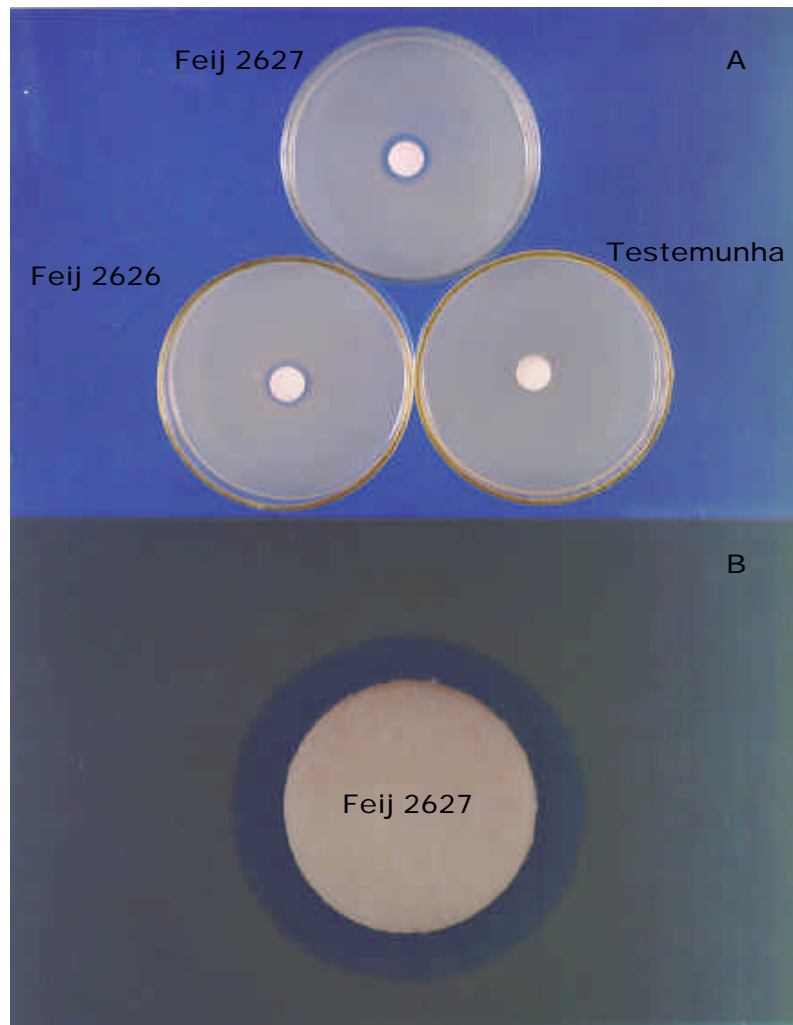


Figura 2 - Halo de inibição ao crescimento dos isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Feij 2716 (A) e Feij 2720 (B), por isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Em relação as bactérias, o isolado Feij 2720 não diferiu em sensibilidade do isolado Feij 2716, mas mostrou-se mais sensível que os isolados Feij 2718, Feij 2719 e Feij 2721, sendo que esses últimos não mostraram diferenças entre si. O isolado Feij 2716 mostrou-se mais sensível que os isolados Feij 2718 e Feij 2721.

4.3 Estudo *in vitro* da produção de substâncias por isolados não patogênicos de *Fusarium* spp. inibitórias a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

A avaliação deste experimento mostrou ter havido inibição do crescimento bacteriano por parte de dois dos três isolados de *Fusarium* spp. testados, conforme o Quadro 6.

O isolado Feij 2708 não produziu substância inibitória ao crescimento da bactéria, a medida que não observou-se formação de halo de inibição em torno do disco de papel, não sendo por isso incluído na análise estatística. Os isolados Feij 2706 e Feij 2707 inibiram o crescimento dos dois isolados bacterianos, formando halos de inibição semelhantes no tamanho do seu diâmetro. Por outro lado, houve uma diferença estatística em relação aos dois isolados bacterianos, sendo que para Feij 2716 o halo de inibição foi menor que para Feij 2720, levando a crer que o último seja mais sensível aos metabólitos produzido pelos fungos ou tenha um crescimento mais lento, que permitiu uma maior difusão dos metabólitos no meio de cultura.

Quadro 6 - Diâmetro médio (mm) do halo de inibição formado por substâncias produzidas por *Fusarium* spp., em meio de cultura com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Isolado Bacteriano	Isolado fúngico			Média
	Feij 2706	Feij 2707	Feij 2708	
Feij 2716	5,5	5,5	0*	5,5** b
Feij 2720	7,3	6,5	0	6,9 a
Média	6,4 A	6,0 A	0	

C.V.= 11,19 %

* Dados não submetidos à análise de variância.

**Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna ou maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4 Estudo *in vitro* da produção de substâncias por isolados de *Fusarium* spp., extraídas por filtragem, inibitórias a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

4.4.1 Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sob agitação.

Este experimento mostrou não haver formação de halo de inibição do crescimento bacteriano em nenhuma das interações de isolados fúngicos com os isolados bacterianos testados, independente da autoclavagem ou não dos extratos obtidos dos isolados de *Fusarium* spp. cultivados.

4.4.2 Isolados fúngicos obtidos em meio líquido sem agitação

Este experimento também mostrou não haver inibição do crescimento bacteriano com a aplicação do extrato filtrado do fungo. Como os resultados repetem os obtidos no experimento anterior, as mesmas considerações feitas naquele servem também para este experimento, pois o fato do cultivo em meio líquido sem agitação e no escuro, parece não ter interferido na produção dos metabólitos desejados.

A diferença constatada em relação ao cultivo com agitação, foi a característica do crescimento do fungo no meio de cultura. Enquanto com agitação o meio adquiriu uma coloração vinho característica de *Fusarium*, no meio sem agitação houve um crescimento branco cotonoso que ficou suspenso na superfície do meio de cultura.

4.5 Avaliação de isolados não-patogênicos de *Fusarium* spp. no controle da murcha-de-*Curtobacterium* em feijoeiro, sob condições de casa-de-vegetação

As avaliações dos sintomas de murcha-de-*Curtobacterium*, em três épocas, das plantas de feijoeiro da cultivar IAC Carioca cultivadas em vaso com substrato infestado ou não com as diferentes concentrações de *Fusarium* spp, encontram-se no Quadro 7.

Não foi constatada eficiência dos tratamentos, nas três épocas de avaliação dos sintomas, na redução da severidade da doença nas plantas inoculadas com o isolado de Cff.

4.6 Avaliação *in vitro* da ação de acibenzolar-S-methyl sobre *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Este ensaio mostrou não ter ocorrido formação de halo de inibição ao redor dos discos de papel-de-filtro tratados com as diversas concentrações do produto. Todos os isolados bacterianos cresceram uniformemente sobre o meio de cultura.

Com isso, observou-se que o produto não possui ação bactericida e/ou bacteriostática, comprovando que seu modo de ação está estritamente relacionado à ação indutora de resistência às plantas.

Quadro 7 – Avaliação dos sintomas da murcha-de-*Curtobacterium* em plantas de feijoeiro cultivar IAC Carioca inoculadas com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, cultivadas em vasos contendo substrato infestado com diferentes concentrações de *Fusarium* spp. não-patogênicos.

Isolados de <i>Fusarium</i> spp.	Concentração do inoculo (v/v)	Dias após a inoculação		
		15	20	25
Testemunha	0	3,67* a	7,33 a	7,83 a
Feij 2706	1:10	3,67 a	7,17 a	7,67 a
	1:50	3,34 a	7,17 a	7,50 a
	1:100	3,00 a	7,00 a	7,34 a
	1:500	3,00 a	7,00 a	7,34 a
Feij 2707	1:10	2,67 a	6,00 a	7,33 a
	1:50	2,67 a	5,77 a	7,17 a
	1:100	2,33 a	5,50 a	7,17 a
	1:500	2,33 a	5,17 a	6,67 a
C.V.(%)		32,6	25,7	18,8

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.7 Avaliação da ação de acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e vigor de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium

4.7.1 Tratamento de sementes de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl

4.7.1.1 Avaliação da germinação

Os resultados referentes ao teste de germinação são apresentados no Quadro 8.

Quadro 8 – Efeito de diferentes concentrações de acibenzolar-S-methyl aplicado em tratamento de sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, sobre a germinação.

Concentrações (g i.a./100 Kg sem.)	Porcentagem de germinação	Porcentagem de plântulas normais	Porcentagem de plântulas anormais e/ou infeccionadas	Porcentagem de sementes mortas
0	93,5	86,5	13,5	0
25	92,5	6,5	93,5	0
50	85,0	0	100	0
75	88,0	0	96,5	3,5

Pode-se observar que embora a germinação tenha sido elevada em todos os tratamentos, ao se examinar as plântulas normais obtidas, a diferença dos tratamentos para com a testemunha (86,5 % de plântulas normais) foi clara. Na dose de 25 g i.a./100 Kg de sementes, apenas 6,5 % das plântulas eram normais, e nas outras dosagens nenhuma das plântulas era normal. As plântulas restantes foram consideradas anormais no seu desenvolvimento ou estavam infeccionadas ou apodreceram

pela ação de fungos e/ou de bactérias. O tratamento na dose de 75 g i.a./100 Kg sementes ainda apresentou 3,5 % de sementes mortas, ou seja, sementes que apesar de estarem aparentemente normais, não germinaram devido a morte do embrião. Ficou constatado o efeito fitotóxico do acibenzolar-S-methyl às sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, quando aplicado na concentração igual ou superior a 25 g i. a./100 Kg de sementes.

4.7.1.2 Avaliação do vigor

No teste de vigor também foi registrada a velocidade de emergência das sementes (Figura 3), além da porcentagem de plantas normais emergidas (Figura 4).

Na Figura 3, pode-se observar que as plantas começaram emergir entre o terceiro e quarto dia após a semeadura, sendo que neste período ocorreu a emergência de 68 % do total de sementes emergidas na testemunha. Nos demais tratamentos, a emergência aumentou entre o quarto e o sexto dia, mas sempre com valores inferiores à testemunha, e tanto menores quanto maior a concentração do acibenzolar-S-methyl utilizado no tratamento das sementes. No nono dia ocorreu a emergência das últimas plantas, totalizando emergências de 93,5, 90,5, 84,0 e 75,5 %, para a testemunha e as concentrações de 25, 50 e 75 g i.a./100 Kg de sementes, respectivamente.

Na avaliação do vigor, através da porcentagem de plantas normais entre o total de plantas emergidas (Figura 4), obtiveram-se os seguintes valores: 96,8, 15,5, 2,4 e 0 %, respectivamente para a testemunha e as concentrações de 25, 50 e 75 g i.a./100 Kg de sementes. As plantas consideradas anormais apresentavam alterações tais como: hipocótilo retorcido, ausência de folhas primárias, morte do meristema apical e formação de folhas pequenas e retorcidas.

Com isso, pode-se verificar o efeito fitotóxico do produto devido à diminuição na velocidade de emergência e a redução drástica do número de plantas normais de feijoeiro formadas.

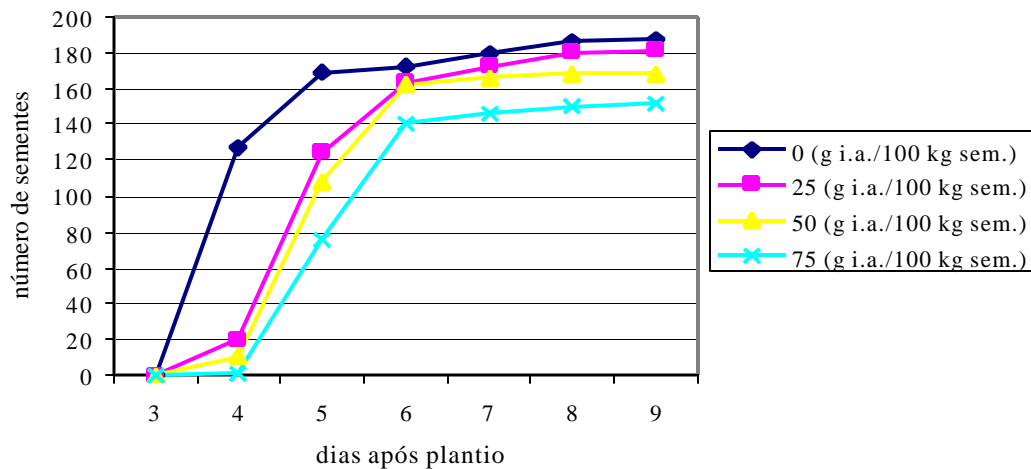


Figura 3- Velocidade de emergência de sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, tratadas com diferentes doses de acibenzolar-S-methyl.

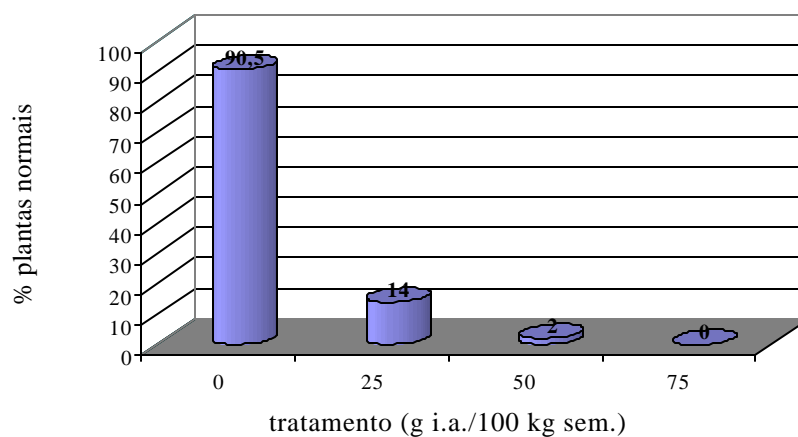


Figura 4 - Porcentagem de plantas normais de feijoeiro emergidas de sementes tratadas com diversas doses de acibenzolar-S-methyl.

4.7.1.3 Avaliação da indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium

A indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, por meio do tratamento de sementes com acibenzolar-S-methyl, não mostrou-se eficaz conforme relacionado no Quadro 9, uma vez que a severidade dos sintomas da doença foi elevada em todos os tratamentos, principalmente nas avaliações realizadas aos 20 e 25 dias após a inoculação das plantas de feijoeiro com Cff.

Houve um aumento progressivo dos sintomas da doença com o transcorrer do tempo, sendo esses mais severos na última avaliação (Quadro 9).

Quadro 9 - Avaliação do tratamento de sementes de feijoeiro, cultivar IAC Carioca com acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium.

Tratamentos (g i.a./100 Kg sem.)	Severidade dos sintomas (notas de 1 a 9)		
	15 dias	20 dias	25 dias
0	3,53*a	6,87 a	7,67 a
25	2,07 a	5,40 a	7,67 a
50	2,33 a	4,87 a	6,60 a
75	2,33 a	5,00 a	6,60 a
CV(%)	42,87	38,20	18,14

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.7.2 Efeito da pulverização em plantas de feijoeiro com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl, na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium

Os resultados deste experimentos são apresentados no Quadro 10, para a avaliação da severidade da doença, e no Quadro 11, para a avaliação do peso seco da parte aérea.

Quadro 10 – Avaliação da severidade dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium, em plantas tratadas com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl.

Tratamento (μg i.a./mL)	Severidade dos sintomas (notas de 1 a 9)		
	15 dias	20 dias	25 dias
0	7,13*a	8,60 a	8,73 a
50	7,27 a	7,80 a	8,33 a
100	7,13 a	7,93 a	8,47 a
250	7,93 a	8,07 a	8,33 a

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 11 - Peso seco da parte aérea das plantas de feijoeiro tratadas com diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl, com e sem inoculação da bactéria.

Tratamento (μg i.a./mL)	Peso seco (g)		Redução do peso (%)
	com inoculação	sem inoculação	
0	3,07* a	17,17 a	82,12
50	3,65 a	11,35 bc	67,84
100	3,40 a	15,05 ab	77,41
250	3,37 a	8,30 c	59,40

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados obtidos mostraram que em todos os tratamentos houve uma alta severidade dos sintomas da doença, já a partir dos 15 dias após a inoculação, evoluindo, gradativamente, nas avaliações seguintes. A análise estatística revelou não ter ocorrido diferenças entre os tratamentos.

Na presença da inoculação das plantas o peso seco da parte aérea mostrou não ter diferença entre os tratamentos, sendo que a redução do peso em relação aos tratamentos sem inoculação variou de 59,40 a 82,12 % (Quadro 11). Já, os tratamentos não inoculados mostraram diferenças entre eles. A testemunha apresentou o maior valor de peso, não diferindo da concentração de 100 µg i.a./mL, mas sendo superior às concentrações de 50 e 250 µg i.a./mL. A concentração de 100 µg i.a./mL foi igual a de 50, mas superior a de 250 µg i.a./mL. Já as de 50 e 250 µg i.a./mL, não diferiram entre si.

Foi observado na concentração de 250 µg i.a./mL, presença de sintomas de fitotoxicidez nas plantas, pois elas apresentavam folhas pequenas e retorcidas, e um desenvolvimento geral menor que nos outros tratamentos. O tratamento com 50 µg i.a./mL não mostrou os sintomas de fitotoxicidez que o tratamento com 250 µg i.a./mL apresentou, não podendo-se atribuir o menor peso das plantas em relação a testemunha, a algum efeito de fitotoxicidade do produto. Essa observação é reforçada pelo fato da concentração de 100 µg i.a./mL não ter diferido da testemunha, não causando problema às plantas.

A concentração de 100 µg i.a./mL, embora não tenha controlado a doença nessa época de aplicação, foi escolhida para ser utilizada como padrão para os demais ensaios com diferentes épocas, pois foi a maior concentração utilizada que não causou problemas às plantas.

4.7.3 Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes da inoculação da bactéria

Os resultados da avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium deste experimento são apresentados no Quadro 12. O peso seco da parte aérea das plantas é apresentado no Quadro 13.

A avaliação dos sintomas mostrou que, aos 15 dias após a inoculação, as plantas inoculadas apresentavam-se afetadas pela bactéria, com notas elevadas, diferenciando da testemunha sem inoculação. A severidade dos sintomas aumentou nas avaliações seguintes.

Independentemente da aplicação do acibenzolar-S-methyl no momento ou dois ou cinco dias antes da inoculação das plantas de feijoeiro, cultivar IAC Carioca, com Cff, não foi constatada a eficácia desse produto para o controle da murcha-de-Curtobacterium, visto pela elevada severidade dos sintomas da doença apresentada pelas plantas inoculadas, nas diferentes épocas de avaliação dos sintomas (Quadro 12).

Quadro 12 - Avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium em plantas pulverizadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, antes da inoculação.

Tratamento	Avaliação (notas de 1 a 9)		
	15 dias	20 dias	25 dias
1. 5 dias antes da inoculação	6,78*ab	8,56 a	8,78 ab
2. 2 dias antes da inoculação	8,22 a	8,56 a	8,89 a
3. no dia da inoculação	6,89 ab	8,33 a	8,89 a
4. testemunha com inoculação	6,55 b	7,11 b	8,00 b
5. testemunha sem inoculação	1,00 c	1,00 c	1,00 c

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 13 - Peso seco da parte aérea de plantas tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, antes da inoculação.

Tratamento (g i.a./100 Kg de semente)	Peso (g de matéria seca)
1. 5 dias antes da inoculação	2,87* b
2. 2 dias antes da inoculação	3,07 b
3. no dia da inoculação	2,89 b
4. testemunha com inoculação	3,37 b
5. testemunha sem inoculação	6,80 a

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise do peso seco da parte aérea das plantas mostrou não ter ocorrido diferença entre os pesos das plantas dos tratamentos inoculados, sendo que estes diferiram da testemunha sem inoculação, que apresentou peso superior.

4.7.4 Avaliação da época de aplicação de acibenzolar-S-methyl antes e após a inoculação da bactéria

Os resultados da avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium deste experimento são apresentados no Quadro 14. O peso seco da parte aérea das plantas é apresentado no Quadro 15.

Foi constatado apenas diferença na severidade dos sintomas da doença na primeira avaliação, realizada aos 15 dias após a inoculação, para a aplicação de acibenzolar-S-methyl aos 5 dias antes da inoculação, em relação aos outros tratamentos sem inoculação das plantas de feijoeiro. Nas avaliações subsequentes ficou evidente a não eficácia do

acibenzolar-S-methyl no controle da murcha-de-Curtobacterium, independente do produto ser aplicado antes e/ou após a inoculação das plantas (Quadro 14).

Quadro 14 - Avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium em plantas tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl antes e após a inoculação.

Tratamento	Avaliação (notas de 1 a 9)		
	15 dias	20 dias	25 dias
1. 5 dias antes	6,20* b	7,80 a	8,59 a
2. 5 dias após + 5 dias após	6,33 ab	7,53 a	8,47 a
3. 5 dias após + 10 dias após	6,60 ab	7,54 a	8,87 a
4. 5 dias após + 5 e 10 dias após	6,47 ab	7,67 a	8,87 a
5. 5 dias após	6,73 ab	7,61 a	8,73 a
6. 10 dias após	7,00 ab	8,33 a	8,73 a
7. 5 e 10 dias após	7,13 ab	8,33 a	8,87 a
8. água todas as épocas	7,93 a	8,60 a	8,87 a
9. água todas as épocas (s/ inoculação)	1,00 c	1,00 b	1,00 b

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi observada redução no desenvolvimento das plantas (menor peso seco da parte aérea) em todos os tratamentos, independente da aplicação do acibenzolar-S-methyl antes e/ou após a inoculação. Todas as plantas apresentaram desenvolvimento reduzido da parte aérea, quando comparadas com a testemunha sem inoculação (Quadro 15).

Quadro 15 - Peso seco da parte aérea de plantas de feijoeiro tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, antes e depois da inoculação com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Tratamento	Peso (g m.s.)
1. 5 dias antes	2,69* b
2. 5 dias antes + 5 dias após	2,93 b
3. 5 dias antes + 10 dias após	2,73 b
4. 5 dias antes + 5 e 10 dias após	2,80 b
5. 5 dias após	2,87 b
6. 10 dias após	2,77 b
7. 5 e 10 dias após	2,76 b
8. água todas as épocas (com inoculação)	2,35 b
9. água todas as épocas (sem inoculação)	8,81 a

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.7.5 Comparação da ação do acibenzolar-S-methyl na indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, em cultivares de feijoeiro com diferentes níveis de resistência à doença

Os resultados da avaliação dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium deste experimento são apresentados no Quadro 16. O peso seco da parte aérea das plantas é apresentado na Figura 5 e a redução do peso seco no Quadro 17.

Pode-se constatar claramente a diferença de reação ao patógeno da cultivar suscetível IAC Carioca com severos sintomas da

doença nos tratamentos com e sem pulverização, em relação às duas cultivares com níveis de resistência (IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã), que praticamente não apresentaram sintomas da doença (Quadro 16). O sintoma de mosaico foi constatado em duas plantas no tratamento 4, aos 25 dias após a inoculação, na cultivar IAC Carioca Akytã. Entre as cultivares, nas três avaliações, foram constatadas diferenças entre IAC Carioca, com alta severidade, e as cultivares IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã, com baixa severidade de sintomas da doença.

Quadro 16 - Severidade dos sintomas da murcha-de-Curtobacterium, em três cultivares de feijoeiro, tratadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, cinco dias antes da inoculação.

Cultivar	15 dias			20 dias			25 dias		
	s/ pulv.	c/ pulv.	média*	s/ pulv.	c/ pulv.	média	s/ pulv.	c/ pulv.	média
IAC Carioca	4,06	4,96	4,75 a	6,67	6,17	6,41 a	8,67	8,50	8,58 a
IAC Carioca Akytã	0,20	1,20	0,70 b	0,40	1,00	0,70 b	0,47	0,60	0,53 b
IAC Carioca Pyatã	0,40	0,20	0,30 b	0,40	0,20	0,30 b	0,40	0,20	0,30 b
Média*	1,55 B	2,12 A		2,49 A	2,45 A		3,18 A	3,10 A	

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra minúscula na coluna, ou maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 17 – Porcentagem de redução do peso seco da parte aérea de três cultivares de feijoeiro pulverizadas com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, cinco dias antes da inoculação.

Cultivar	Redução do peso seco (%)		
	s/ pulv.	c/ pulv.	média*
IAC Carioca	50,22	39,80	45,01 a

IAC Carioca Akytã	21,39	29,28	27,27 b
IAC Carioca Pyatã	24,99	29,56	25,34 b
Média*	32,20 A	32,88 A	

*Média de 5 repetições. Dados seguidos da mesma letra minúscula na coluna, ou maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

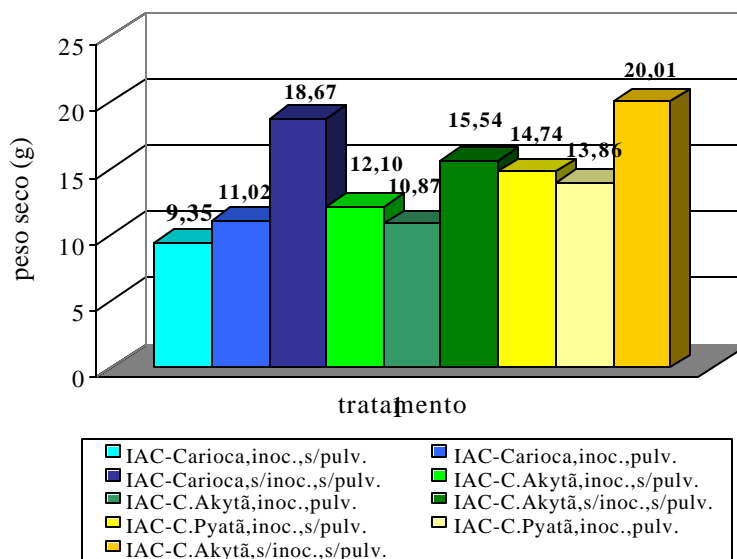


Figura 5 - Peso seco da parte aérea de três cultivares de feijoeiro tratadas ou não com 100 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl, cinco dias antes da inoculação com *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

O peso seco da parte aérea permitiu a confirmação de algo que já tinha sido observado visualmente nas plantas, que foi o menor desenvolvimento da maioria das plantas inoculadas das cultivares resistentes, em relação as não inoculadas, embora não tenham apresentado sintomas da doença. Mesmo assim, a redução de peso (Quadro 17) provocada pela doença na cultivar suscetível foi maior (45,01 %), do que para as cultivares IAC Carioca Akytã (25,34 %) e IAC Carioca Pyatã (27,27 %). Não houve diferença entre a média de redução de peso dos tratamentos pulverizados (32,88 %) e não pulverizados (32,20 %).

4.7.6 Análise da atividade de peroxidases (POD, EC 1.11.1.7), polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.1) e nível de proteínas totais solúveis em três cultivares de feijoeiro pulverizadas com acibenzolar-S-methyl

Os resultados das análises de POD, PFO e nível de proteínas totais solúveis estão ilustrados nas Figuras 6, 7 e 8, e as análises comparando-se as diferentes cultivares e os tratamentos com e sem pulverização são apresentados nos Quadros 18, 19 e 20.

Quadro 18 – Área abaixo da curva de progresso da atividade de peroxidases em três cultivares de feijoeiro, com e sem pulverização de acibenzolar-S-methyl.

Cultivar	Folha			Caule		
	s/ pulv.	c/ pulv.	Média*	s/ pulv.	c/ pulv.	Média
IAC Carioca	3,79	5,00	4,40 b	1,65	2,10	1,88 a
IAC Carioca Akytã	4,25	6,18	5,22 a	2,09	2,42	2,25 a
IAC Carioca Pyatã	4,07	5,11	4,59 ab	1,51	2,17	1,83 a

4,04 B	5,43 A	1,75 B	2,22 A
--------	--------	--------	--------

*Dados seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 19 – Área abaixo da curva de progresso da atividade de polifenoloxidasas em três cultivares de feijoeiro, com e sem pulverização de acibenzolar-S-methyl.

Cultivar	Folha			Caule		
	s/ pulv.	c/ pulv.	Média*	s/ pulv.	c/ pulv.	Média
IAC Carioca	0,90	0,93	0,92 a	0,14	0,18	0,16 a
IAC Carioca Akytã	0,91	0,93	0,92 a	0,15	0,16	0,16 a
IAC Carioca Pyatã	0,94	0,86	0,90 a	0,12	0,18	0,15 a
	0,91 A	0,91 A		0,14 B	0,17 A	

*Dados seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 20 – Área abaixo da curva de progresso do nível de proteínas solúveis em três cultivares de feijoeiro, com e sem pulverização de acibenzolar-S-methyl.

Cultivar	Folha			Caule		
	s/ pulv.	c/ pulv.	Média*	s/ pulv.	c/ pulv.	Média
IAC Carioca	239,46	274,75	257,11 a	28,59	50,18	39,37 a
IAC Carioca Akytã	191,73	253,23	222,48 a	27,68	38,32	33,00 a
IAC Carioca Pyatã	273,60	262,09	267,85 a	33,24	46,29	39,76 a
	234,93 A	263,36 A		29,84 B	44,92 A	

*Dados seguidos da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

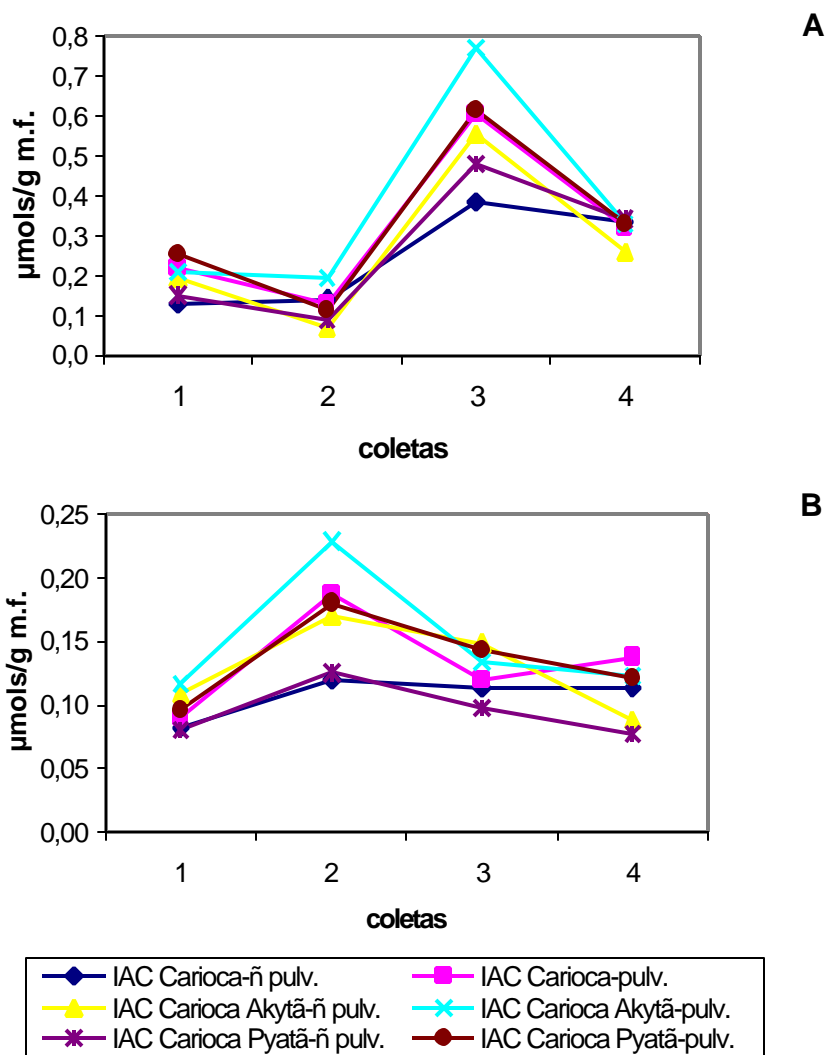


Figura 6 - Atividade de peroxidases nas folhas (A) e caule (B) de cultivares de feijoeiro pulverizados ou não com acibenzolar-S-methyl.

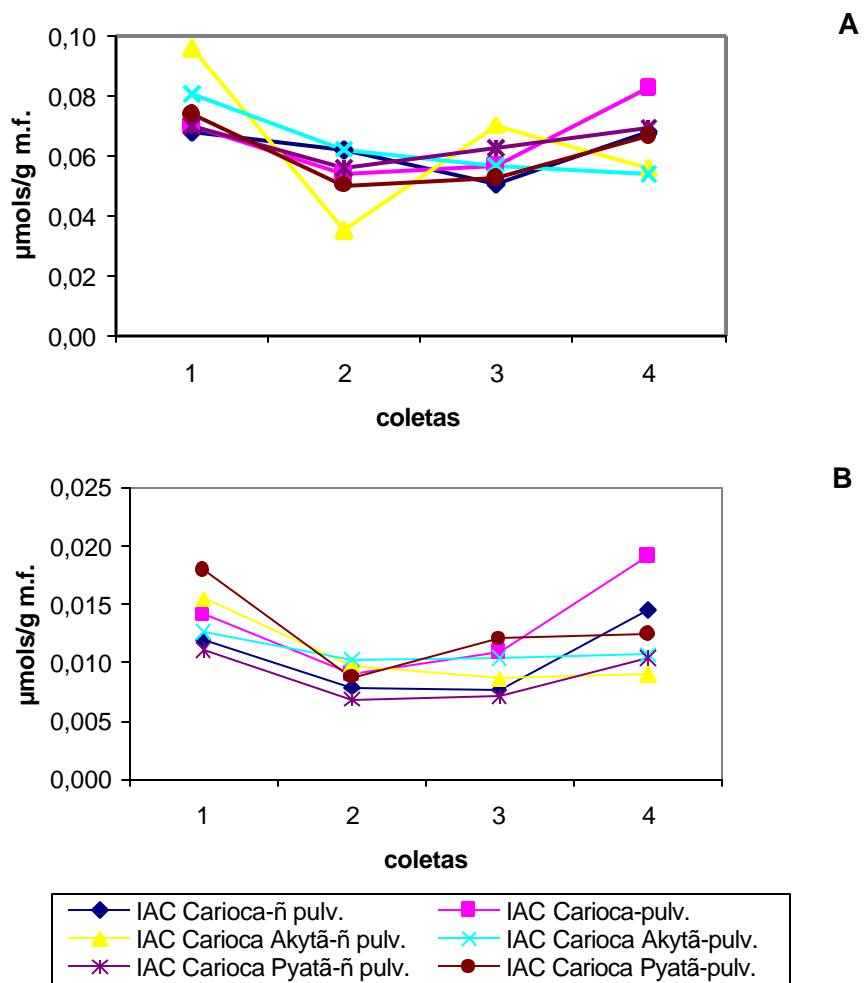


Figura 7 - Atividade de polifenoloxidasas nas folhas (A) e caule (B) de cultivares de feijoeiro pulverizados ou não com acibenzolar-S-methyl.

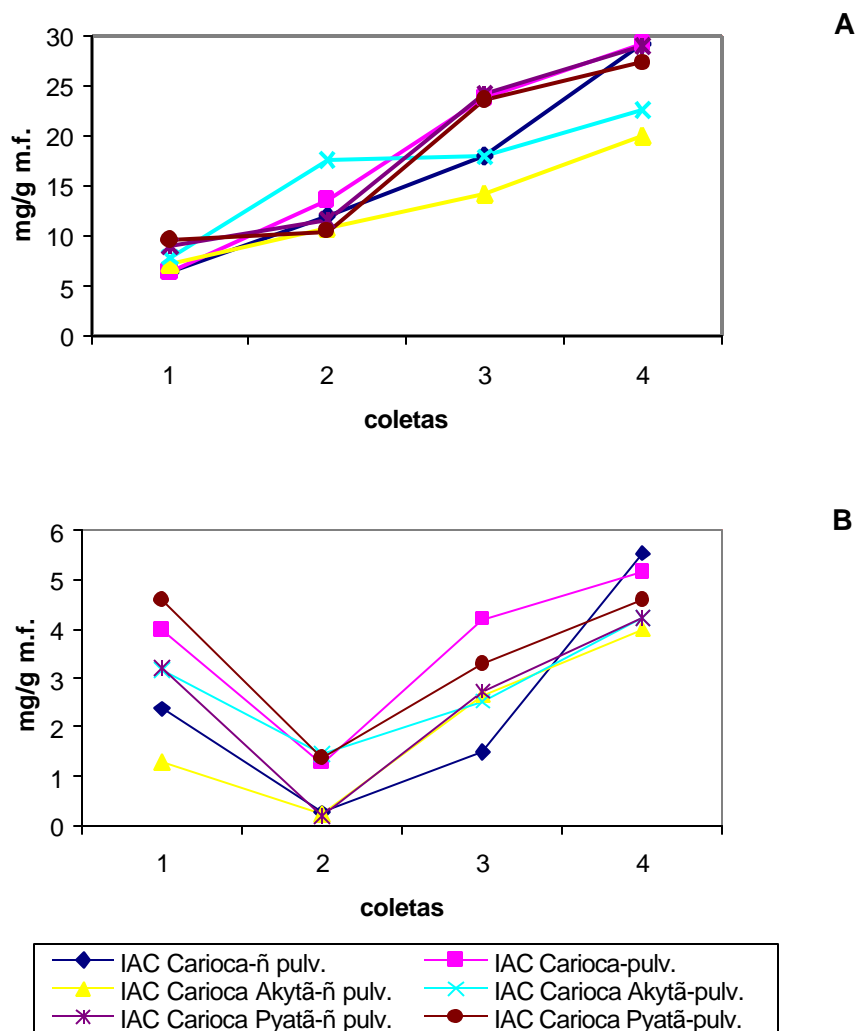


Figura 8 – Nível de proteínas totais solúveis nas folhas (A) e caule (B) de cultivares de feijoeiro pulverizados ou não com acibenzolar-S-methyl.

A análise da POD (Quadro 18; Figura 6) mostrou, na folha, maior atividade na cultivar IAC Carioca Akytã em relação a IAC Carioca. A cultivar IAC Carioca Pyatã mostrou atividade intermediária de POD. Os tratamentos pulverizados com acibenzolar-S-methyl evidenciaram maior atividade de POD que os não-pulverizados, acusando um efeito do indutor de resistência na atividade dessa enzima. A atividade de POD no caule foi semelhante nas cultivares de feijoeiro, embora tenha ocorrido uma tendência da cultivar IAC Carioca Akytã apresentar maior atividade, como constatado na folha. Os tratamentos pulverizados, tanto na folha como no caule, mostraram maior atividade em relação aos não-pulverizados. Também cabe salientar que a atividade de POD na folha foi, em média, cerca de 2,4 vezes maior do que no caule.

A análise da atividade de PFO (Quadro 19; Figura 7) não mostrou, na folha, diferença entre as cultivares e entre os tratamentos com e sem pulverização. No caule, não houve diferença entre as cultivares, mas os tratamentos pulverizados mostraram uma maior atividade dessa enzima que os não-pulverizados. Em média, a atividade de PFO no caule das cultivares de feijoeiro foi cerca de 9 vezes menor do que na folha.

O nível de proteínas totais solúveis (Quadro 20; Figura 8) não mostrou, na folha, diferença entre as cultivares, nem entre os tratamentos com e sem pulverização. Foi observado um aumento constante e uniforme dos níveis de proteínas em relação ao tempo. Já no caule, não observou-se diferença entre as cultivares, mas o tratamento pulverizado diferiu do não-pulverizado, mostrando um aumento no seu nível, pelo provável efeito do indutor de resistência. A partir da segunda coleta os níveis aumentaram regularmente. O nível de proteínas totais solúveis no caule foram, em média, cerca de 6 vezes menor que na folha.

5 DISCUSSÃO

5.1 Controle biológico de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Pelos resultados obtidos nos diferentes ensaios, foi constatada a produção *in vitro* de metabólitos pelos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, que foram tóxicos aos isolados de Cff (Quadro 5). Essas substâncias poderiam estar relacionadas à competição de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* por nichos ecológicos no ambiente e também ocupar espaços na colonização de vasos de xilema nas plantas de feijoeiro, sendo que fatores como patogenicidade, densidade de inóculo e condições ambientes seriam determinantes para o maior sucesso de um ou de outro na colonização do hospedeiro.

Os isolados não patogênicos de *Fusarium* spp. (Feij 2706 e Feij 2707) também inibiram a bactéria *in vitro* (Quadro 6). Essa constatação abre possibilidades para estudos da utilização destes como agentes de controle biológico, à medida que foram encontrados colonizando plantas de feijoeiro, sem serem patogênicos às plantas.

As espécies do gênero *Fusarium* são produtoras de diversas substâncias que podem ter efeito tóxico a outros organismos. Entre elas incluem-se as micotoxinas, fitotoxinas, antibióticos, pigmentos e enzimas. Toxinas como licomarasmina, ácido fusárico, zearalenona, fusarina, moniliformina e outras, têm sido estudadas em diversos experimentos científicos quanto aos seus efeitos na planta e a capacidade de controlarem bactérias e fungos fitopatogênicos (Drysedale et. al., 1984; McLean, 1996). O trabalho de Eged & Srobarova (1994) descreve isolados de *F. oxysporum* como produtores de ácido fusárico, sendo este tóxico a *Bacillus subtilis*.

Baker et al. (1990) reforça a constatação da importância do gênero *Fusarium* como agente de controle biológico de corinebactérias, já que foi constatada atividade antimicrobiana de compostos extraídos de culturas de *F. solani* e *F. oxysporum*, que inibiram o desenvolvimento de *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*.

Por outro lado, o estudo da produção de substâncias *in vitro*, por isolados de *Fusarium* spp. cultivados em meio de cultura líquido, extraídas por filtração mostrou não haver inibição do crescimento de Cff por parte dos extratos fúngicos. Esse resultado diferiu dos obtidos no experimento onde se cultivou o fungo sobre os discos de papel, e não em meio líquido. Isto leva a crer que o fungo necessita de algum fator não identificado, obtido só quando cultivado no meio sólido e em contato direto com o disco de papel, que leva a produção de substâncias inibitórias a Cff.

Gamal et al. (1987) constataram que a atividade enzimática de *Cochliobolus sativus*, agente causal da mancha marrom da cevada, foi maior em amostras da teia micelial, do que em filtrados extraídos do crescimento fúngico dos diversos isolados testados. Isto pode indicar a ocorrência de perdas de propriedades importantes durante o processo de filtração, que prejudiquem o fungo na sua atividade patogênica e de antagonismo a outros microrganismos. Segundo os mesmos autores, a atividade enzimática do fungo também foi maior nos isolados mais patogênicos.

Johnson et al. (1982) relataram a falta de produção de substâncias inibitórias por parte de isolados de *F. oxysporum* quando cultivados em condições anaeróbicas, o que não se aplica ao presente caso, já que havia oxigênio disponível para o fungo na superfície do meio, sendo ainda sua difusão favorecida pela agitação.

Com isso, constata-se a necessidade de pesquisas mais específicas, direcionadas a desvendar os fatores que levam o fungo a ter diferentes comportamentos com a mudança de metodologia de cultivo, e

detectar problemas inerentes aos processos de extração dos metabólitos fúngicos.

A avaliação dos isolados não-patogênicos de *Fusarium* spp. no controle da murcha-de-Curtobacterium, inoculados em feijoeiro em casa-de-vegetação, indicou que os isolados avaliados, embora sejam produtores de substâncias inibitórias *in vitro* a isolados de Cff, quando aplicados no substrato não produziram compostos que fossem capazes de serem absorvidos e translocados pelas plantas de feijoeiro para bloquear e/ou retardar o desenvolvimento da colonização de Cff nos vasos do xilema das plantas (Quadro 7).

Segundo Andrews (1985), muitos antagonistas eficientes *in vitro* não mostram essa mesma eficiência em condições naturais. A variabilidade das condições ambientes é um grande problema a ser considerado, principalmente em testes a campo. Mas isso não significa necessariamente que antagonistas que falharam *in vivo* não tenham algum valor e devam ser descartados. Manipulações para proteger o inóculo ou melhorar suas características de colonização podem ser feitas. Também pode-se utilizar esses antagonistas como fonte de genes em melhoramento genético.

Um fator que pode ter sido relevante para a ineficiência do controle da doença neste ensaio, foi o fato de que a infestação do solo com *Fusarium* spp. pode não ter possibilitado o contato direto do fungo com Cff, inoculado diretamente no caule. No ensaio *in vitro*, o cultivo no meio de cultura possibilitou esse contato direto entre os microrganismos.

5.2 Efeito do acibenzolar-S-methyl no tratamento de sementes de feijoeiro

A avaliação da germinação permitiu aferir que o acibenzolar-S-methyl, nas concentrações testadas, não foi adequado para o

tratamento de sementes de feijoeiro no que se refere à germinação, principalmente por provocar a formação de grande quantidade de plântulas anormais (Quadro 8). Não foi encontrado na literatura ensaios testando o efeito do tratamento de sementes de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl. Mas o trabalho de Jensen et al. (1998) demonstrou significativa redução de algumas doenças, em duas espécies de brássicas que tiveram suas sementes tratadas com diferentes concentrações de acibenzolar-S-methyl. Por outro lado, Lustosa et al. (1999) constataram redução da germinação de sementes de tomateiro imersas em soluções a partir da concentração de 0,5 g/L, sendo maior a redução quanto maior a concentração do produto.

Na avaliação do vigor, verificou-se o efeito fitotóxico do produto devido à diminuição na velocidade de emergência (Figura 3) e a redução drástica do número de plantas normais de feijoeiro formadas (Figura 4). Além disso, o tratamento de sementes não mostrou-se eficaz no controle da murcha-de-Curtobacterium (Quadro 9).

Segundo Pascholati (1999), algumas observações têm sido feitas sugerindo que efeitos colaterais de ativadores de resistência possam, sob certas circunstâncias, afetar negativamente a fisiologia da planta e/ou que a indução da resistência tenha um custo energético para ela. Nos dados observados neste ensaio os efeitos negativos sobre a fisiologia das plantas foram bastante severos, verificando-se que o tratamento de sementes de feijoeiro com acibenzolar-S-methyl, nas concentrações utilizadas, não é recomendado.

Apesar disto, não se deve descartar a possibilidade de novas pesquisas com concentrações inferiores a 25 g i.a./100 Kg de sementes, que não venham causar fitotoxicidade. Evidentemente, essas concentrações devem estar atreladas a eficiência do indutor no controle da doença estudada.

O baixo vigor, decorrente de fatores não infecciosos como no caso do efeito do indutor, pode predispor à ação mais severa de

patógenos durante o ciclo da cultura (Carvalho & Nakagawa, 2000). Por isso, mesmo em aplicações de acibenzolar-S-methyl em concentrações inferiores às utilizadas no presente trabalho, que não venham a causar sintomas visíveis de fitotoxicidade, deve-se atentar para o fato de poder ocorrer a predisposição a infecções por patógenos.

Romero et al. (2001), em trabalho onde aplicaram acibenzolar-S-methyl na indução de resistência em pimentão a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, apoiaram a hipótese de que a indução de mecanismos de resistência resultou em um custo energético para planta e citaram vários trabalhos onde plantas tratadas com indutor de resistência apresentaram maiores produções que plantas não tratadas, na presença de patógenos, mas menores produções na ausência de patógenos.

5.3 Indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium com acibenzolar-S-methyl

A avaliação de diversas concentrações de acibenzolar-S-methyl para a indução de resistência à murcha-de-Curtobacterium, aplicado em pulverizações de plantas de feijoeiro, permitiu verificar que o indutor de resistência, nas concentrações e época aplicadas, não controlou a doença, e que a concentração de 250 µg i.a./mL causou fitotoxicidade às plantas (Quadro 10).

Romeiro et al. (1999) avaliaram o efeito fitotóxico e no controle do cretamento bacteriano, em pulverizações de plantas de feijoeiro, das concentrações de 50, 100, 250, 500, 1000 e 2000 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl. A concentração de 100 µg i.a./mL mostrou-se mais eficiente no controle da bacteriose e ocasionou pouca fitotoxicidade. Essa mesma concentração foi escolhida, no presente trabalho, para as avaliações seguintes com pulverizações em diferentes épocas em relação a inoculação do patógeno. Nestes ensaios, constatou-se a ineficiência do

acibenzolar-S-methyl no controle da murcha-de-Curtobacterium (Quadros 12, 13, 14 e 15).

Com isso, especula-se que a colonização vascular de Cff não foi afetada pelos mecanismos de defesa induzidos pelo acibenzolar-S-methyl.

A comparação da ação do acibenzolar-S-methyl no controle da murcha-de-Curtobacterium, em cultivares com diferentes níveis de resistência à doença, também mostrou não haver eficiência do produto no controle da doença (Quadros 16 e 17; Figura 5).

Pode-se constatar claramente a diferença de reação ao patógeno da cultivar suscetível IAC Carioca com severos sintomas da doença nos tratamentos com e sem pulverização, em relação às duas cultivares com níveis de resistência (IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã), que praticamente não apresentaram sintomas da doença. Esses resultados confirmam os obtidos por Maringoni (2000), que indicaram um provável mecanismo de resistência nessas cultivares que dificultou e/ou retardou a colonização dos vasos do xilema pela bactéria.

Em feijoeiro, alguns trabalhos têm evidenciado o efeito da aplicação do acibenzolar-S-methyl na redução da severidade dos sintomas do crestamento bacteriano, causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Jesus Júnior et al., 1999). Entretanto, para o patossistema feijoeiro – *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* a aplicação do acibenzolar-S-methyl não desencadeou o processo de indução de resistência (Siegrist et al., 1997), fato semelhante foi observado no ensaio aqui conduzido com as diferentes cultivares de feijoeiro e Cff.

Em relação a análise bioquímica de enzimas e proteínas, o acibenzolar-S-methyl mostrou-se indutor da POD, tanto na folha como no caule das plantas, antecipando prováveis reações bioquímicas de defesa que só seriam ativadas, por exemplo, com o ataque de um patógeno (Quadro 18).

O aumento da atividade da POD seria resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram um estresse, aumentando a atividade da enzima (Gaspar et al., 1985). Com isso, a planta provavelmente estaria em condições de mostrar resistência contra patógenos aos quais normalmente seria suscetível. Mas isso não foi constatado no ensaio para controle da murcha-de-*Curtobacterium* com acibenzolar-S-methyl.

A relação positiva entre a atividade da POD e a resistência de plantas a doenças, tem sido relatada em diversos trabalhos. O aumento da atividade da POD durante o desenvolvimento da doença tem se correlacionado com a expressão de resistência em diferentes patossistemas (Hammerschmidt & Kuc, 1982; Hammerschmidt et al., 1982; Coffey & Cassidy, 1984).

Brisset et al. (2000) obtiveram proteção de mudas de macieira contra *Erwinia amylovora*, agente causal da queima bacteriana, através da aplicação de 100 e 200 µg i.a./mL de acibenzolar-S-methyl imediatamente antes da inoculação. Os mesmos autores constataram que a proteção das plantas está associada a duas famílias de enzimas relacionadas à defesa, peroxidases e beta-1,3-glucanases.

A maior atividade de POD na folha da cv. IAC Carioca Akytã pode-se dever a característica de resistência natural a algumas doenças apresentadas por esta cultivar (Maringoni, 2000). Li & Li (1998), estudando a atividade de POD em folhas de cultivares de pepino infectadas por *Cladosporium cucumerinum*, constataram que a atividade foi significativamente maior nas cultivares resistentes do que nas suscetíveis. Resultados semelhantes foram observados por Komarova & Davidovich (1997) na cultura do arroz, onde as cultivares resistentes a ferrugem apresentaram atividade de peroxidase 1,5-3 vezes maior que as suscetíveis.

Ao que tudo indica, a PFO está pouco relacionada ao processo de indução de resistência, pois no caule, onde ocorreu a diferença

entre os tratamentos, a atividade foi baixa se comparada com a da folha, levando a supor que essa diferença seja irrelevante no processo de indução de resistência (Quadro 19). Resende et al. (2000) não encontraram diferenças na atividade de PFO em plantas de cacau induzidas pelo benzotiadiazole, mas mencionaram a possibilidade de terem ocorrido mudanças qualitativas nas isoformas, que não foram possíveis de se medir, ou que as mudanças tenham ocorrido em períodos diferentes das épocas de coleta. As isoformas de enzimas presentes nos vegetais variam tanto quantitativamente, quanto qualitativamente, de acordo com a espécie, tecido e estágio de desenvolvimento (Galston & Davies, 1969), ou em função da interação da planta com o ambiente. Além disso, podem ser alteradas por fatores como luz, temperatura, pH e qualquer tipo de estresse (Siegel, 1993).

Os trabalhos sobre a atividade de PFO e resistência de plantas, apresentam resultados variados em relação ao papel da enzima, dependendo da cultura e agente indutor utilizado; mas na sua maioria levam a crer que a PFO, quando comparada com a peroxidase, tem participação secundária no processo de resistência.

Li & Li (1998) observaram que cultivares de pepino, resistentes a *C. cucumerinum*, apresentaram maior atividade de PFO do que cultivares suscetíveis, mas apenas nos estágios iniciais após a infecção com o patógeno, não diferindo nos estágios mais avançados. Komarova & Davidovich (1997) não encontraram diferença na atividade de PFO entre plantas de arroz com e sem infecção de ferrugem, independente do grau de resistência das cultivares testadas, e Li et al. (1991) também não observaram relação entre a atividade desta enzima e a resistência de cultivares de amendoim a ferrugem.

Por outro lado, Solorzano et al. (1996) estudando a indução sistêmica de POD e PFO, pela aplicação de NaH_2PO_4 em tomateiro, concluíram haver uma relação entre essas enzimas e a resistência. Sendo

que a atividade foi maior entre 10 e 15 dias, decaindo após 45 dias do tratamento.

A literatura cita diversos trabalhos ressaltando o papel de proteínas e glicoproteínas nos mecanismos de resistência das plantas (Pascholati & Leite, 1995). Os resultados do presente trabalho, por terem mostrado diferença no nível de proteínas totais solúveis entre tratamentos com e sem pulverização, sugerem haver influência do indutor. Mesmo assim, os resultados não permitiram concluir se ocorreram alterações que seriam relevantes no processo de resistência, pois, além das diferenças terem ocorrido no caule, onde os níveis de proteínas totais solúveis foram baixos se comparados aos da folha, também houve um aumento natural, com o tempo, dos níveis em todos os tratamentos (Figura 8).

As concentrações mais elevadas na folha do que no caule, dos três compostos avaliados, podem estar relacionadas com a maior eficiência da aplicação de acibenzolar-S-methyl no controle de patógenos que usualmente colonizam folhas do que patógenos vasculares. Estes últimos, como no caso de Cff, geralmente colonizam os vasos de xilema, e são mais difíceis de serem controlados. A maior atividade de POD nas folhas, proporcionado pela aplicação do acibenzolar-S-methyl, pode desencadear mecanismos de resistência às doenças causadas por patógenos foliares.

Bashan (1986) constatou, em plântulas sadias de algodão, que compostos fenólicos, oxidados principalmente por polifenoloxidasas, mas também por peroxidase e catalase, foram encontrados em maior concentração em folhas do que no caule, e em maior concentração em cultivares resistentes do que em suscetíveis. Cabe salientar, que diferentes isoformas das enzimas podem ser encontradas durante as fases de evolução de uma interação hospedeiro-indutor-patógeno, indicando que a atividade enzimática é influenciada por esta interação, que torna-se determinante na expressão de resistência da planta à doença.

A ineficiência do acibenzolar-S-methyl no controle da murcha-de-Curtobacterium, apesar da constatação de que o produto aumentou a atividade de POD na folha e no caule, e de PFO e proteínas totais solúveis no caule, poderia indicar que outros mecanismos ou compostos estariam envolvidos na ativação dos mecanismos de resistência das plantas neste patossistema em particular. A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos representados por barreiras bioquímicas e estruturais, como, por exemplo, o aumento de enzimas oxidativas como a POD, acúmulo de fitoalexinas, quitinases, β -1,3-glucanases, proteínas-RP e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, bem como a lignificação dos tecidos (Pascholati & Leite, 1995).

Alguns trabalhos têm demonstrado evidências de que nem todos os genes relacionados com defesa da planta foram dependentes da ativação do ácido salicílico, ao qual o acibenzolar-S-methyl é análogo (Venâncio et al., 2000). O etileno e o ácido jasmônico também são dois reguladores de crescimento vegetal relacionados com a indução de resistência sistêmica, e foram constatados induzindo uma proteína-RP de defesa, que não foi induzida por ácido salicílico (Penninckx et al., 1998).

Outro aspecto que pode ser relevante para a ineficiência dos tratamentos realizados, é a rápida taxa de multiplicação e a menor suscetibilidade a reações oxidativas que bactérias fitopatogênicas costumam ter, principalmente quando comparadas a maioria dos fungos fitopatogênicos (Farkas & Király, 1962; Kosuge, 1969). Com isso, a Cff poderia estar apto a suplantiar os mecanismos de defesa induzidos pelo acibenzolar-S-methyl, levando a planta a ficar doente.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios permitiram concluir que:

1) Isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Fusarium* spp. provocaram redução no crescimento de Cff *in vitro*.

2) Isolados não patogênicos de *Fusarium* spp. não foram eficazes em controlar a murcha-de-Curtobacterium, em plantas de feijoeiro da cultivar IAC Carioca, cultivadas em vaso, sob condições de casa-de-vegetação.

3) O tratamento de sementes com acibenzolar-S-methyl, nas doses utilizadas, foi prejudicial à germinação e ao vigor do feijoeiro e não induziu resistência murcha-de-Curtobacterium em feijoeiro da cultivar IAC Carioca.

4) A pulverização de acibenzolar-S-methyl nas doses e épocas utilizadas, para a cultivar IAC Carioca, não foram eficazes para induzir resistência à murcha-de-Curtobacterium.

5) A pulverização de acibenzolar-S-methyl em plantas de feijoeiro aumentou a atividade de peroxidase na folha e no caule, polifenoloxidase e proteínas totais solúveis no caule de plantas de feijoeiro das cultivares IAC Carioca, IAC Carioca Akytã e IAC Carioca Pyatã, porém sem induzir resistência à murcha-de-Curtobacterium.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[†]

ANDREWS, J. H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C.L.; LINDON, S.E. *Biological control on the phylloplane*. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p. 31-44.

ARCILA, M. J., TRUJILLO, G. Identificación de bacterias fitopatógenas en semillas de frijol (*Vigna unguiculata* (L) Walp subsp. *unguiculata*). *Agron. Trop. (Maracay)*, v. 40, n. 4-6, p. 193-203, 1990.

BAKER, R. A., TATUM, J. H., NEMEC JR., S. Antimicrobial activity of naphthoquinones from fusaria. *Mycopathologia*, v. 111, n. 1, p. 9-15, 1990.

BALARDIN, R. S., PASTOR-CORRALES, M. A., OTOYA, M. M. Resistência de germoplasmas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Fitopatol. Bras.*, v. 15, p. 102-3, 1990.

BASHAN, Y. Phenols in cotton seedlings resistant and susceptible to *Alternaria macrospora*. *J. Phytopathol.(Berl.)*, v.116, p.1-10, 1986.

BENHAMOU, N., BELANGER, R. R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. *Plant Physiol. (Sofia)*, v. 118, n. 4, p.1203-12, 1998a.

BENHAMOU, N., BELANGER, R. R. Induction of systemic resistance to *Pythium damping-off* in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Plant J.*, v. 14, n. 1, p.13-21, 1998b.

[†] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrônomicas. *Normas para a elaboração de dissertações e teses*. Botucatu, 1997. 35p.

- BETTIOL, W., GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIN, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Ceres, 1995. p. 717-8.
- BOOTH, C. *The genus fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. p.130-54.
- BORDELEAU, L. M., MICHAUD, R. Association between resistance to bacterial wilt and symbiotic nitrogen fixation in alfafa. *Phytoprotection*, v. 62, n. 1, p.33-43, 1981.
- BRADBURY, J. F. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Ferry Lane: C.A.B. International Mycological Institute, 1986. 332p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRESSANI, R., ELIAS, L. G. Nutritional values of legume crops for humans and animals. In: SUMMERFIELD, R. J., BUNTING, A. H. (Ed.). *Advances in legume science*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1980. p.135-55.
- BRISSET, M. N., CESBRON, S., THOMSON, S. V., PAULIN, J. P. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-relate enzymes in apple and protects from fire blight. *Eur. J. Plant Pathol.*, v. 106, p. 529-36, 2000.
- BURKER, D. W., SELISKAR, C. E. Disease incidence and yields of beans in relation to cultivation injury in North Dakota Colorado. *Plant Dis. Rep.*, v. 41, p. 483-7, 1957.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. Trop. Méd. Hyg.*, v. 70, p. 181-4, 1967.

- CARVALHO, N. M., NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. 4^oed., Jaboticabal: Funep, 2000. 588p.
- CLEMENTE, E.; PASTORE, G. M. Peroxidase and polyphenoloxidase, the importance for food technology. *Bol. SBCTA*, v.32, p.167-71,1998.
- COFFEY, M. D., CASSIDY, D. S. M. Peroxidase activity and induced lignification in rusted flax interactions varying in their degree of incompatibility. *Can. J. Bot.*, v. 62, p. 134-41, 1984.
- COSTA, A. F., COELHO NETO, R. A., MIRANDA, P. Métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijão visando seleção de linhagens resistentes. *Fitopatol. Bras.*, v. 14, n. 2, p. 135, 1989.
- COYNE, D. P., SCHUSTER, M. L. “Emerson”, a new large-seeded Great Northern dry bean variety tolerant to bacterial wilt disease. *Univ. Nebr. Agric. Exp. Stn. Bull.*, v. 516, p. 1-11, 1971.
- COYNE, D. P., SCHUSTER, M. L. “Great Northern Star” dry bean tolerant to bacterial diseases. *Hortscience*, v. 11, p. 621, 1976.
- COYNE, D. P., SCHUSTER, M. L. Breeding and genetic studies of tolerance to several bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens. *Euphytica*, v. 23, p. 651-56, 1974.
- DEB, P. R., DUTTA, B. K. Studies on biological control of foot rot disease of soybean caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, v. 98, p. 539-46, 1991.

- DIATLOFF, A., WONG, W. C., WOOD, B. A. Non-destructive methods of detecting *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in mugbean seeds. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 16, p. 269-73, 1993.
- DINESEN, I. G. The movement of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Proc. Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria*, v. 2, p.929-33, 1978.
- DRYSDALE, R. B., MOSS, M. O., SMITH, J. E. The production and significance in phytopathology of toxins produced by species of *Fusarium*. *Br. Mycol. Soc. Symp.* 7, p. 95-105, 1984.
- EDREVA, A. Host-parasite relations: biochemistry. In: Mckeen, W. E. (Ed.). *Blue Mold of Tobacco*. St. Paul: APS, 1989. p.105-140.
- EGED, S., SROBAROVA, A. Bioassay for selection of fusaric acid-producing e non-producing strains of *Fusarium oxysporum* (Schlecht). *Biol. Bratislava*, v. 49, p. 825-8, 1994.
- FAO. *Production Yearbook*. Food and Agriculture Organization, Rome, v. 54, p. 99-100, 2000.
- FARKAS, G. L., KIRÁLY, Z. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Phytopathology*, v. 44, p. 105-50, 1962.
- FROSHEISER, F. I., BARNES, D. K. Field reaction of artificially inoculated alfalfa populations to the fusarium and bacterial wilt pathogens alone and in combination. *Phytopathology*, v. 68, p. 943-46, 1978.
- GALSTON, A. W., DAVIES, P. J. Hormonal regulation in higher plants. *Science (Washington D.C.)*, v.163, p. 1288-97, 1969.

- GAMAL EL DIN, I. F., GHOBRIAL, E., EL DEEB, A. A., AHMED, K. G. M., ELIAN, M. I. Enzyme activity in relation to infection with spot blotch of barley. *Agric. Res. Rev.*, v. 65, p. 213-23, 1987. In: C. A. B. Abstr. CD-ROM, v. 3A, 1990/1991. (Abstract 912305697)
- GASPAR, T., PENEL, C., CASTILLO, F. J., GREPPIN, H. A. Two step control of basic and acidic peroxidase and significance for growth and development. *Physiol. Plant.*, v. 64, p. 418-23, 1985.
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates genes expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, v. 8, p.629-43, 1996.
- HAMMERSCHMIDT, R., KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiol. Plant Pathol.*, v. 20, p. 61-71, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, R., NUCKLES, E., KUC, J. Association of enhance peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.*, v. 20, p. 73-82, 1982.
- HEDGES, F. A bacterial wilt of bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science (Washington D.C.)*, v. 55, p. 433-34, 1922.
- HEDGES, F. Bacterial wilt of bean (*Bacterium flaccumfaciens* Hedges), including comparisons with *Bacterium phaseoli*. *Phytopathology*, v. 15, p. 1-21, 1926.
- JENSEN, B. D., LATUNDE DADA, A. O., HUDSON, D., LUCAS, J. A. Protection of Brassica seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with

- CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pestic. Sci.*, v. 52, p.63-9, 1998.
- JESUS JÚNIOR, W. C., ROMEIRO, R. S., RODRIGUES, F. A., PEREIRA, J. L. A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. *Fitopatol. Bras.*, v. 24, supl., p.293, 1999. (resumo).
- JOHNSON, L. E. B., FROSHEISER, F. I., WILCOXSON, R. D. Interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* and *Corynebacterium insidiosum* in alfafa. *Phytopathology*, v. 72, n. 5, p. 517-22, 1982.
- KAR, M., MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.*, v. 57, p.315-9, 1976.
- KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, T. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 32, p.439-59, 1994.
- KNIGHT, S. C., ANTHONY, V. M., BRADY, A. M., GREENLAND, A. J., HEANEY, MURRAY, D. C., POWELL, K. A., SCHULTZ, M. A., SPINKS, C. A., WORTHINGTON, P. A., YOULE, D. Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 35, p.349-72, 1997.
- KOMAROVA, E. P.; DAVIDOVICH, L. A. Involvement of phenolcarbonic acids and phenol-oxidizing enzymes in rye defense necrotic response to leaf rust infection. *Russian J. Plant Physiol.*, v.44, p.749-55, 1997.
- KOSUGE, T. The role of phenolics in the host response to infection. *Annu. Rev. Phytopathol.*, v. 7, p. 195-222, 1969.

- LI, B. J., LI, F. Y. Changes in activities and electrophoretic patterns of peroxidase and polyphenoloxidases in cucumbers during infection with *Cladosporium cucumerinum*. *Scientia Agricultura Sinica*, v.31, p.86-88, 1998.
- LI, D., WANG, Z. Z., LIN, K. H. Relationships between activity of several enzymes and peanut resistance to rust. *J. South China Agric. University*, v.12, p.1-6, 1991. In: C. A. B. Abstr. CD-ROM, v.5, 1992. (Abstract 922316184)
- LIMA, G. P. P. *Efeito do cálcio sobre o teor de poliaminas, peroxidase e nitrato redutase em calos de arroz (Oryza sativa L. cv IAC 4440)*. Botucatu, 1994. 84p. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- LUSTOSA, D. C., ROMEIRO, R. S., MAIA, C. B. Exposição de sementes de tomateiro a um derivado benzotiadiazólico e testagem das plântulas resultantes quanto a efeitos de toxidez e a indução de resistência a patógenos. *Fitopatol. Bras.*, v. 24, supl., p.251, 1999. (resumo).
- MANDEEL, Q., BAKER, R. Mechanisms involved in biological control of Fusarium wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, v. 81, p.462-9, 1991.
- MARINGONI, A. C. *Detecção de Xanthomonas campestris pv. phaseoli (Smith) Dye em sementes de feijoeiro e consequências epidemiológicas*. Piracicaba, 1993. 132p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz / Universidade de São Paulo.
- MARINGONI, A. C. *Caracterização de isolados de Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-Curtobacterium*. Botucatu, 2000. 73p. Tese (Livre-Docência na Disciplina de Fitopatologia/Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

- MARINGONI, A. C., ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. *Fitopatol. Bras.*, v. 21, supl., p. 336, 1996. (resumo).
- McLEAN, M. The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: an update since 1989. *Mycopathologia*, v. 133, n. 3, p. 163-79, 1996.
- MORAES, M. G. Mecanismos da Resistência Sistêmica Adquirida em Plantas. *Rev. An. Patol. Plant.*, v. 6, p.261-84, 1998.
- MORAES, W. B. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. In: BETTIOL, W.(Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, p.157-79, 1991.
- NASCIMENTO, S. R. C. *Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *phaseoli* Kend. & Snyd.: *Esporulação, raça Fisiológica e Comportamento de Variedades e Linhagens de Feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. Botucatu, 1992. 92p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agronômicas / Universidade Estadual Paulista.
- NIKITINA, K. V., BUDANOVA, V. I., STEPANOVA, S. I., YASKINA, O. S. Rapid method of evaluating resistance of lupin and bean to bacterial diseases. *Selektiva i Semenovodstvo*, v. 5, p. 22-3, 1980. In: C. A. B. Abstr. CD-ROM, v. 0C, 1979/1981. (Abstract 811374113)
- NIKITINA, K. V., BUDANOVA, V. I., STEPANOVA, S. I., YASKINA, O. S. Study of *Phaseolus* and lupinus for resistance to bacterial diseases. *Trudy po Prikladnoi Botanike. Genetike i Seleksii*, v. 72, n. 1, p. 103-10, 1982. In: C. A. B. Abstr. CD-ROM, v. 1, 1984/1986. (Abstract 851642819)

- PASCHOLATI, S. F. Bioquímica fitopatológica e indução de resistência. *Fitopatol. Bras.*, v. 24, supl., p. 241, 1999.
- PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.444-5.
- PENNINCKX, Y. A. M. A., THOMMA, B. P. H. J., BUCHALA, A., METRAUX, J. P., BROEKAERT, W. F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathway is required for induction of a plant defense gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 10, p. 2103-13, 1998.
- PIETERSE, C. M. J., WEES, S. C. M., HOFFLAND, E., PELT, J. A. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacterial is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, v. 8, p.1225-37, 1996.
- RESENDE, M. L. V., NOJOSA, G. B. A., AGUILAR, M. A. G., SILVA, L. H. C. P., NIELLA, G. R., CARVALHO, G. A., GIOVANINI, G. R., CASTRO, R. M. Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis perniciosus* através do benzotiadiazole (BTH). *Fitopatol. Bras.*, v. 25, p. 149-56, 2000.
- RIBEIRO, R. L. D., HAGEDORN, D. J. Screening for resistance to and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. *Phytopathology*, v. 69, p. 272-6, 1979.
- RICKARD, S. F., WALKER, J. C. Mode of inoculation and host nutrition in relation to bacterial wilt of bean. *Phytopathology*, v. 55, n. 5, p. 174-8, 1965.
- ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995. 283p.

- ROMEIRO, R. S., RODRIGUES, F. A., JESUS JÚNIOR, W. C., PEREIRA, J. L. A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiadiazólico. *Fitopatol. Bras.*, v. 24, supl., p.255, 1999. (resumo).
- ROMERO, A. M., KOUSIK, C. S., RITCHIE, D. F. Resistance to bacterial spot bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. *Plant Dis.*, v. 85, p. 189-94, 2001.
- ROSS, A. F. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*, v. 14, p. 329-39, 1961.
- SAETTLER, A. W. Diseases caused by bacteria. In: HALL, R. (Ed.). *Compendium of bean diseases*. St. Paul: APS, 1991. p. 29-32.
- SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, v. 1, p. 231-3, 1975.
- SCHNEIDER, R. W., WILLIAMS, R. J., SINCLAIR, J. B. Cercospora leaf spot of cowpea: models for estimating yield loss. *Phytopathology*, v. 66, p. 384-8, 1976.
- SCHUSTER, M. L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. *Plant Dis. Rep.*, v. 43, p. 27-32, 1959.
- SHREE, M. P., HAREESHA, H. A. Effect of sorghum phyllosphere fungi on the incidence of helminthosporiose disease. *Curr. Sci.(Bangalore)*, v. 57, p.126-8, 1988.
- SIEGEL, B. Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regul.*, v. 12, p. 303-12, 1993.

- SIEGRIST, L., GLENEWINKEL, D., KOLLE, C., SCHMIDTKE, M. Chemical induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, v. 104, n. 6, p.559-610, 1997.
- SOLORZANO, E.; HERNANDEZ, S.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, A. Inducción sistémica de peroxidasas y polifenoloxidasas frente a *Alternaria solani* en tomate por acción del Na_2PO_4 . *Ver. Prot. Veg.*, v.11, p.29-32, 1996.
- TAKATSU, A. Taxonomía de corinebacterias fitopatogénicas. In: LUZ, W. C. (Ed.). *Ver. An. Pat. Plant.*, vol. 3, p. 85-110, 1995.
- TEZUKA, N., MAKINO, T. Biological control of Fusarium wilt of strawberry by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolated from strawberry. *Annals Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 57, p.506-11,1991.
- TREPCZYNSKA, A. A. Resistance to bacterial diseases in leguminous crops. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin*, v. 150, p. 159-64, 1983. In: C. A. B. Abstr. CD-ROM, v. 1, 1984/1986. (Abstract 841632112)
- TUITE, J. *Plant pathological methods; fungi and bacteria*. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.
- YAMAGUCHI, K., KIDA, M., ARITA, M. TAKAHASHI, M. Induction of systemic resistance by *Fusarium oxysporum* MT0062 in solanaceous crops. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, v. 58, p.16-22, 1992.
- VANSCHOONHOVEN, A., PASTOR-CORRALES, M. A. *Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia, 1987. 56p.

VENANCIO, W. S., ZAGONEL, J., FURTADO, E. L., SOUZA, N. L. de, PERES, N. A. R. Novos fungicidas. II – famoxadone e indutores de resistência. *Rev. An. Pat. Plant.*, v. 8, p. 59-92, 2000.

VENETE, J. R., LAMPPA, R. S., GROSS, P. L. First report of bean bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in North Dakota. *Plant Dis.*, v. 79, p. 966, 1995.

VIEIRA, J. L. T. M. Produção e comercialização no Brasil. In: ZIMMERMANN, M J. O., RICHA, M., YAMADA, T. (Ed.). *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba, Associação para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1988. p. 21-36.