

Leandro Camargo Borsato

**Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)
à ferrugem e mecanismos de defesa elicitados por *Uromyces appendiculatus*.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson M. Di Piero

Florianópolis, 2009

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitotecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Prof. Dr. Marciel J. Stadnik pelos ensinamentos, orientação e pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Robson M. Di Piero pelo apoio e conselhos oferecidos.

Aos membros da banca examinadora: professores César A. Butignol (UFSC) e José A. Martinelli (UFRGS) e ao pesquisador João A. Wordell Filho (EPAGRI) pelas sugestões.

À técnica de laboratório Maria Luisa Peixoto e ao doutorando Lírio Dal Vesco, do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, pela colaboração e atendimento.

Aos colegas Sandra Sassse, Diogo Kloch Ferreira e Taina Soraia Muller pelo incentivo.

Ao amigo Danilo Medeiros pelo apoio e companheirismo.

E a todos os mestrandos e estagiários do Laboratório de Fitopatologia e funcionários do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	ix
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. HIPÓTESES.....	4
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
4.1 A cultura do feijoeiro.....	5
4.2 Ferrugem do feijoeiro.....	6
4.3 Resistência quantitativa.....	8
4.4 Indução de resistência.....	9
4.5 Peroxidases.....	10
4.6 Glucanases.....	12
4.7 A macroalga <i>Ulva fasciata</i>	13
4.8 Ulvana.....	14
5. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) À FERRUGEM.....	16
INTRODUÇÃO.....	16
5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1.1 Condições de cultivo.....	17
5.1.2 Obtenção e manutenção do inóculo.....	18

5.1.3 Inoculação das plantas.....	20
5.1.4 Determinação do período de incubação (PI), período de latência (PL) e número de pústulas (NP).....	21
5.1.5 Determinação do diâmetro de pústulas (DP).....	21
5.1.6 Índice de doença (ID).....	22
5.1.7 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	23
5.2. RESULTADOS.....	24
5.2.1 Número de pústulas.....	24
5.2.2 Diâmetro de pústulas.....	24
5.2.3 Reação de resistência com base no índice de doença (ID).....	26
2.4 Período de incubação (PI) e período de latência (PL).....	28
5.2.5 Correlação dos componentes de resistência.....	29
5.3 DISCUSSÃO.....	30
6. MECANISMOS DE DEFESA ELICITADOS POR ULVANA CONTRA <i>Uromyces appendiculatus</i>	35
INTRODUÇÃO.....	35
6.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
6.1.1 Obtenção da ulvana a partir da alga <i>Ulva fasciata</i>	36
6.1.2 Cultivo, tratamento, inoculação, avaliação do número de pústulas/cm ² e diâmetro das pústulas.....	37
6.1.3 Análises microscópicas.....	37
6.1.4 Determinação da atividade de peroxidases.....	38
6.1.5 Determinação da atividade de glucanases.....	40
6.1.6 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	42
6.2. RESULTADOS.....	43
6.2.1 Número de pústulas.....	43
6.2.2 Diâmetro das pústulas.....	44

6.2.3 Análises microscópicas.....	45
6.2.4 Atividade de peroxidases.....	46
6.2.5 Atividade de β-1,3 glucanases.....	47
6.3. DISCUSSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8. ANEXOS.....	72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Temperaturas médias, mínimas e máximas mensais na casa-de-vegetação durante a realização dos experimentos.....17
- Tabela 2.** Classe comercial, grupo e número do acesso no Banco de Germoplasma da EAFRS, conforme as cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) testados quanto à resistência à ferrugem.....19
- Tabela 3.** Descrição e evolução dos estádios fenológicos vegetativos para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivado em condições de casa-de-vegetação nos meses de maio a dezembro de 2007 no Centro de Ciências Agrárias, UFSC. Adaptado de FANCELLI & DOURADO NETO (1997).....20
- Tabela 4.** Descrição da escala de notas.....23
- Tabela 5.** Período de latência (PL), número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²), diâmetro de pústulas (DP), índice de doença (ID) em relação ao PMS e reação de resistência à ferrugem de 37 cultivares comerciais, crioulos e linhagens de feijoeiro, 15 dias após a inoculação com *U. appendiculatus*.....27
- Tabela 6.** Análise de correlação entre os componentes de resistência das diferentes cultivares de *P. vulgaris* à ferrugem do feijoeiro.....29

Tabela 7. Número de pústulas /cm² no segundo trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados com de ulvana (10 mg/mL), 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....43

Tabela 8. Diâmetro médio das pústulas no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados com de ulvana (10 mg/mL), 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....44

Tabela 9. Porcentagem da germinação de uredósporos e formação de apressórios por *U. appendiculatus* sobre a superfície foliar de cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados ou não com ulvana.....45

Tabela 10. Atividade de peroxidases 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados ou não com o ulvana (10 mg/mL).....47

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Grupos de resistência à ferrugem do feijoeiro de acordo com o índice de doença (ID): (A) cv. BR IPA -11 Brígida – Resistente; (B) cv. Pérola – Moderadamente Suscetível; (C) cv. CHP 97-04 – suscetível e (D) cv. SCS 202 Guará – altamente suscetível.....25
- Figura 2.** Pontos necróticos em folíolo de feijoeiro cv. FT 9112-49, aos 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....26
- Figura 3.** Diagrama ilustrativo de uma folha trifoliolada de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na posição adaxial, onde foram determinadas as atividades de peroxidases (FE: folíolo esquerdo) e as atividades de glucanases (FD: folíolo direito). O folíolo central (FC) foi utilizado para as análises microscópicas.....40
- Figura 4.** Germinação de uredósporos de *U. appendiculatus* sobre a superfície abaxial dos trifólios de feijoeiro observados 48 horas após a inoculação.....46
- Figura 5.** Atividade de glucanases 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, Pérola e IPR Juriti pulverizados com ulvana ou água destilada.....48

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Valores do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²) e diâmetro das pústulas (DP) no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro, 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....72
- Anexo 2.** Análise de variância da porcentagem do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²), no primeiro trifólio, em relação ao padrão moderadamente sustentável (PMS) das cultivares de feijoeiro, 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....73
- Anexo 3.** Análise de variância da porcentagem dos diâmetros das pústulas (DP), das cultivares de feijoeiro em relação ao PMS no primeiro trifólio, 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....74
- Anexo 4.** Análise de variância da porcentagem dos valores do índice de doença (ID), das cultivares de feijoeiro em relação ao cv. Pérola no primeiro trifólio 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....75
- Anexo 5.** Resultado do teste de agrupamento de médias de Scott Knott 5% para o número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²), no primeiro trifólio, em relação ao cv. Pérola, das cultivares de feijoeiro 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....76
- Anexo 6.** Resultado do teste de agrupamento de médias Scott Knott 5% para porcentagem dos diâmetros das pústulas em relação ao PMS das cultivares de feijoeiro 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....77

Anexo 7. Resultado do teste de agrupamento de médias Scott Knott 5% para a porcentagem do índice de doença (ID) das cultivares de feijoeiro em relação ao cv. Pérola, avaliados 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.....78

Anexo 8. Análise de variância do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²) e diâmetro das pústulas (DP) no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*.....79

Anexo 9. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²) no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*.....80

Anexo 10. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% do diâmetro médio das pústulas no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*.....80

Anexo 11. Análise de variância da porcentagem da germinação de uredóporos e número de apressórios sobre o primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus* e avaliados 48 horas após a inoculação.....81

Anexo 12. Resultado do teste de separação de média LSD (5%) da porcentagem da germinação de uredóporos e formação de apressórios sobre o primeiro trifólio em cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus* e avaliados 48 horas após a inoculação.....82

Anexo 13. Análise de variância da atividade da enzima peroxidase 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação.....82

Anexo 14. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% da atividade de peroxidase 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação...83

Anexo 15. Curva-padrão de proteína e equação da concentração de proteína utilizando ABS (albumina de soro bovino) como proteína-padrão e reagente de BRADFORD diluído.....84

Anexo 16. Curva padrão de glicose e equação da concentração de glicose.....84

Anexo 17. Análise de variância da atividade de glucanases (μ Katal/mg de proteína) nos folíolos do primeiro trifólio, determinada 48 horas após a inoculação com *U. appendiculatus*, nas cultivares de feijoeiro comum (*P. vulgaris*) do grupo comercial carioca: Pérola, IPR Juriti e BR IPA-11 Brígida pulverizados com o polissacarídeo ulvana (10 mg/mL), 6 e 3 dias antes da inoculação.....61

Anexo 18. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% da atividade de glucanases em folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*, avaliados 48 horas após a inoculação.....61

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) À FERRUGEM E MECANISMOS DE DEFESA ELICITADOS POR ULVANA CONTRA *Uromyces appendiculatus*.

RESUMO

Verificou-se a reação de 37 cultivares comerciais, crioulos e linhagens de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) quanto aos componentes quantitativos de resistência à ferrugem. As avaliações foram efetuadas em plantas inoculadas artificialmente com suspensão de uredósporos de *Uromyces appendiculatus* em casa-de-vegetação, em cinco experimentos independentes. As plantas foram observadas diariamente a fim de se determinar o período de incubação e de latência. Aos 15 dias após a inoculação, quantificou-se o número de pústulas/cm² (NP) e o diâmetro de pústulas (DP) no primeiro trifólio, os quais foram utilizados para o cálculo do índice de doença (ID). As reações de resistência foram classificadas por meio de teste de agrupamento de médias Scott Knott (5%) em relação ao padrão moderadamente suscetível (cv. Pérola). Posteriormente, três cultivares de feijoeiro do grupo carioca apresentando diferentes níveis de resistência à ferrugem, BR IPA – 11 Brígida (resistente), Pérola (moderadamente suscetível) e IPR Juriti (suscetível), selecionadas na etapa anterior, foram usados para comparar a atividade de peroxidases, glucanases e o desenvolvimento de *U. appendiculatus*. Para tanto, as plantas foram pulverizadas com ulvana (10 mg/mL) ou com água destilada (testemunha) 6 e 3 dias antes da inoculação. A severidade da doença foi avaliada através do número e diâmetro das pústulas no primeiro trifólio 15 dias após a inoculação. Para determinar a germinação dos uredósporos e a formação de

apressórios, discos foliares (9 mm) foram coletados 48 h após a inoculação do folíolo central, clareados e conservados em lactoglicerol até o exame em microscópio óptico. As atividades de peroxidases e glucanases foram determinadas nos primeiros trifólios das plantas de feijoeiro 48 h após a inoculação. As diferentes cultivares apresentaram variabilidade para todas as características avaliadas, exceto para o período de incubação e latência, que foi 9 e 11 dias, respectivamente. As linhagens FT 991159 e FT 84-113 não apresentaram sintomas da doença e foram consideradas imunes. Com base no índice de doença, seis cultivares foram classificadas como resistentes, 19 como moderadamente suscetíveis, seis como suscetíveis e quatro como altamente suscetíveis. As plantas pulverizadas com ulvana apresentaram redução do diâmetro das pústulas. A porcentagem de germinação de uredósporos e a formação de apressórios foi maior na cv. BR IPA – 11 Brígida. Foi observada a interação positiva entre a pulverização de ulvana e a cv. Pérola que apresentou maior atividade de glucanases em relação ao controle. As atividades de peroxidases e glucanases foi maior na cv. IPR Juriti em comparação a cv. BR IPA - Brígida.

Evaluation of resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) to rust and defence mechanisms elicited by ulvan against *Uromyces appendiculatus*.

ABSTRACT

The resistance reaction of 37 commercial cultivars, land races and lines of common bean (*Phaseolus vulgaris*) were verified by evaluating qualitative components. The disease evaluation was performed under greenhouse conditions in plants inoculated with uredospore suspension of *Uromyces appendiculatus*, on five independent experiments. The plants were examined daily to determine the incubation and latent period. The number of pustules / cm² (NP) and diameter of pustules (DP) were quantified in the first trifoliated leaf at 15 days after inoculation and used to calculate the disease index (ID). The resistance reaction was classified by means of cluster analysis of Scott Knott (5%) always in relation to the moderately resistant control (cv. Pérola). In a follow up experiment, three selected cultivars of carioca commercial group showing different levels of resistance to bean rust, *i.e.* BR IPA – 11 Brígida (resistant), Pérola (moderately resistant) and IPR Juriti (susceptible), were used to compare the activities of peroxidases and glucanases as well as the development of *U. appendiculatus*. The plants were pulverized with ulvan at 10 mg/mL or with distilled water (control) 6 and 3 days before inoculation. To determine the germination of the uredospores and the apleria formation, foliar discs (9mm) were collected 48 hours after the inoculation, leached and maintained in lactoglycerol until microscopical examination. The peroxidases and glucanases activity was determined in first trifoliated leaves 48 after inoculation. The three cultivars showed variability for all characterizes

evaluated, except for incubation and latent period, which were 9 and 11, respectively. The lines FT 991159 and FT 84-113 did not show any disease symptoms and were considered immune. According to disease index, six cultivars were classified as resistant, 19 moderately resistant, six susceptible and four highly susceptible. The cultivars showed differences in number of pustules / cm². The ulvan spray reduced the diameter of pustules at a similar extent and the plants pulverized with ulvan showed reduction in pustules diameters. The percentage of uredospore germination and the apressoria formation was high in BR IPA – 11 Brígida. A positive interaction between ulvan spray and cv. Pérola was observed, that presented the highest glucanase activity in relation to their control plants. The activities of peroxidases and glucanases in cv. IPR Juriti were higher than in comparison of BR IPA – 11 Brígida.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O feijão é considerado um alimento de grande importância econômica e social, constituindo uma das principais fontes de proteína utilizada na alimentação da população brasileira. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta originária das Américas e é cultivado em praticamente todo o território nacional, em diferentes sistemas de cultivo (FANCELLI, & DOURADO NETO, 1997).

Fatores como a utilização inadequada do solo, desequilíbrio nutricional e ocorrência de pragas podem juntamente com as doenças, causar a redução da produtividade e da qualidade do grão de feijão. Dentre o grande número de doenças às quais a cultura do feijoeiro está sujeita, a ferrugem causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger é considerada uma das mais importantes, podendo causar grandes danos de até 45% na produção em cultivares suscetíveis se as condições ambientais forem favoráveis à doença (JESUS JUNIOR *et al.*, 2001).

Muitos estudos têm demonstrado que a resposta de plantas de feijoeiro à infecção de ferrugem, quando medida através de componentes da resistência, tais como número e tamanho de lesões, área foliar infetada e produção de esporos variam entre as cultivares com diferentes níveis de resistência. Apesar da existência de muitas cultivares resistentes à ferrugem, o controle genético dessa doença é dificultado devido à existência de muitas raças fisiológicas e à alta taxa de variabilidade deste patógeno (SINGH, 2001; SILVA *et al.*, 2001).

Devido aos problemas ambientais causados pelo uso de agrotóxicos e aos frequentes relatos do aparecimento de isolados de *U. appendiculatus* resistentes aos fungicidas, a agricultura moderna exige o

desenvolvimento de medidas alternativas de controle. A indução de resistência pode ser entendida como o aumento da atividade dos mecanismos estruturais e/ou bioquímicos de respostas de defesa da planta pela utilização de agentes externos, de origem biótica ou abiótica. Os polissacarídeos obtidos de algas marinhas, tal como a ulvana, têm demonstrado efeito como potencial indutor de respostas de defesa das plantas. Nesse sentido, os objetivos do trabalho são caracterizar fontes de resistência à ferrugem no feijoeiro e avaliar a capacidade da ulvana em induzir resistência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Classificar cultivares comerciais, crioulas e linhagens de feijoeiro quanto à reação de resistência ao isolado MANE - 4 de *U. appendiculatus* e verificar respostas de defesa elicitadas pelo polissacarídeo ulvana em cultivares caracterizadas como resistente, moderadamente suscetível e suscetível à ferrugem do feijoeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Testar em casa-de-vegetação, a resistência a *U. appendiculatus* dos diferentes cultivares de feijoeiro no estágio fenológico V₃, classificando-os através dos componentes de resistência a ferrugem do feijoeiro.

- Verificar microscopicamente o desenvolvimento de *U. appendiculatus* 48 horas após a inoculação em cultivares de feijoeiro do grupo carioca identificados como suscetível, resistente e na cultivar Pérola, tratados ou não com ulvana.

- Estudar a atividade das enzimas peroxidases e glucanases 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em cultivares de feijoeiro do grupo carioca identificados como suscetível e resistente à ferrugem e no cultivar Pérola, tratados ou não com ulvana.

3. HIPÓTESES

Os diferentes cultivares crioulos, comerciais e linhagens de feijoeiro apresentam diferenças quanto ao número de pústulas/cm², diâmetro das pústulas e período de latência apresentando resistência qualitativa e/ou quantitativo ao isolado MANE - 4 de *U. appendiculatus*.

A aplicação foliar do polissarídeo *ulvana*, em plantas de feijoeiro, pode induzir respostas de resistência relacionadas com a atividade de peroxidases e glucanases reduzindo a severidade da ferrugem do feijoeiro.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 A cultura do feijoeiro

O feijoeiro é uma planta herbácea, de ciclo anual de 60 a 120 dias, pertencente à família Fabaceae, da ordem Fabales (ITIS, 2008). Dentre as cerca de 30 espécies do gênero *Phaseolus* descritas, apenas *Phaseolus vulgaris* L. (feijoeiro comum), *Phaseolus coccineus* L. (feijão ayocote), *Phaseolus polyanthus* Greenm., *Phaseolus acutifolius* A. Gray. e *Phaseolus lunatus* L. (feijão lima) foram domesticadas pelos povos pré-colombianos. *P. vulgaris* é a espécie com maior distribuição mundial, sendo cultivada nos trópicos e também nas zonas temperadas dos hemisférios norte e sul. A domesticação ocorreu em dois centros de origem, a Mesoamérica (México e América Central) e a região dos Andes (sul do Peru, Bolívia e norte da Argentina) há aproximadamente 7000 anos (SINGH, 2001). O feijão é um alimento tradicional na culinária brasileira, independente da classe social. O hábito alimentar de grande parte da população se baseia na mistura arroz e feijão. Do ponto de vista nutricional, o feijão contém carboidratos complexos, proteínas, fibras, oligossacarídeos, e minerais como cálcio, ferro, potássio, manganês e zinco (ANDERSON *et al.*, 1999).

Mais da metade da produção brasileira de feijão é constituída pelo tipo carioca, que é o preferido pelos consumidores da região centro-oeste e, seguido pelo feijão preto, preferido na região sul e nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os outros tipos (feijões vermelho, branco, canário, jalo, rajado e rosinha) aparecem em menor quantidade (NETO & ITO, 2006).

No Estado de Santa Catarina, o feijoeiro é cultivado sob diferentes condições edafo-climáticas e por agricultores que possuem diferentes níveis de tecnologia (ELIAS *et al.*, 2005). Entretanto, esta cultura está em declínio no estado desde a década de 90. A grande suscetibilidade das lavouras de feijão às adversidades climáticas, que resulta em perda de qualidade e de produtividade dos grãos, fortaleceu a tendência dos agricultores substituírem por outras atividades mais produtivas e de menor risco (EPAGRI, 2008).

Dentre os fatores que limitam a produção de feijão destacam-se o baixo uso de tecnologia, o déficit hídrico e a suscetibilidade dos cultivares às pragas e doenças. O feijoeiro é hospedeiro de vários patógenos de etiologia fúngica, bacteriana, virótica, além dos nematóides. As doenças causam, em média, danos consideráveis na produção de feijão, apesar do uso de produtos fitossanitários (ZUPPI *et al.*, 2005).

4.2 Ferrugem do feijoeiro

A ferrugem do feijoeiro é uma das doenças foliares que causam redução da produção de feijão em todas as partes do mundo onde a planta é cultivada. A ferrugem é causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*, que pertence ao Filo Basidiomycota, classe Urediniomycetes da ordem Uredinales (ITIS, 2008). O fungo completa todo o ciclo em um único hospedeiro (autóico). A ferrugem do feijoeiro frequentemente infecta as folhas, mas também pode ser encontrada em vagens, ramos e em todas as partes verdes das plantas de feijão. Os uredósporos são as estruturas reprodutivas responsáveis pela infecção,

sobrevivência e disseminação do patógeno. Os picnidiósporos e aeciosporos são raramente observados na natureza (MCMILLAN *et al.*, 2003).

A infecção ocorre quando os uredósporos germinam sobre a planta suscetível e a penetração do patógeno ocorre através dos estômatos. Os primeiros sintomas podem ser observados na superfície abaxial das folhas, 6 a 7 dias após a infecção, como pequenas manchas esbranquiçadas levemente salientes, recobertas pela cutícula da folha, que aumentam de tamanho com o desenvolvimento da doença, até que aos 10 a 12 dias rompem a epiderme formando pústulas maduras marrom-avermelhadas, que caracterizam o sintoma típico da doença. As temperaturas mais adequadas para a germinação dos uredósporos estão entre 12,5° a 22° C, com o máximo entre 17° a 22 °C. Mesmo sob temperatura superior a 30° C, têm sido observadas epidemias de ferrugem, desde que existam elevada umidade relativa do ar e orvalho, os uredósporos são disseminados a grandes distâncias pelo vento (BIANCHINI *et al.*, 2005)

A doença pode gerar danos de 20 a 45% na produção de feijão. Os danos podem ser mais severos quanto mais cedo a doença ocorrer no ciclo da cultura, sendo também influenciados pelas condições climáticas e suscetibilidade das cultivares (JESUS JUNIOR *et al.*, 2001).

O fungo *U. appendiculatus* é um patógeno biotrófico que apresenta grande variabilidade genética. Somente em Minas Gerais, de 13 isolados obtidos, sete constituíram raças diferentes, confirmando a alta variabilidade nas populações deste fungo. Esta variabilidade tem como consequência a superação dos genes de resistência a cada safra (SOUZA *et al.*, 2003). Dessa forma, visando contornar as dificuldades

nos estudos da variabilidade desse patógeno por diferentes grupos de pesquisa, foi proposta uma nova série diferenciadora, contendo seis cultivares de origem andina e seis cultivares de origem meso-americana para classificar os patótipos de *U. appendiculatus* (STEADMAN *et al.*, 2002). Usando esta metodologia, foram identificados vários patótipos em diferentes partes do mundo (LIEBENBERG *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2005).

Dentre as medidas de controle da ferrugem, a utilização de cultivares resistentes tem recebido atenção dos pesquisadores por ser um método relativamente eficiente, seguro, barato e acessível a produtores de qualquer nível econômico (FALEIRO *et al.*, 2001). O controle químico, quando usado pode contaminar o ambiente e afetar a saúde humana. Além disso, é pouco adotado por pequenos produtores que não utilizam técnicas avançadas de cultivo, principalmente pela necessidade de conhecimento especializado e pelos elevados custos (ALZATE-MARIN *et al.*, 2004).

4.3 Resistência quantitativa

As plantas ao longo do processo evolutivo, desenvolveram mecanismos de resistência a doenças que envolvem complexas alterações no metabolismo celular. Este processo é realizado pela interação específica entre os produtos de genes específicos de resistência do hospedeiro e o produto do gene de avirulência do patógeno. O nível de resistência é uma consequência da velocidade e eficácia da ativação desses sistemas (NISHIMURA & SOMERVILLE, 2002).

A resistência de cultivares de feijoeiro à ferrugem pode ocorrer de maneira qualitativa e quantitativa. A resistência qualitativa é caracterizada pela inexistência de respostas intermediárias entre plantas resistentes ou suscetíveis frente à determinada raça do patógeno (CAMARGO, 1995). Até o momento, são conhecidos 12 genes de resistência à ferrugem em todo o mundo (BASSETT, 2003).

A resistência quantitativa à ferrugem do feijoeiro caracteriza-se por uma redução na taxa de desenvolvimento da doença, através da combinação de componentes como a redução na frequência de infecção, períodos de latência mais longos, diminuição na produção de esporos e menor período infeccioso (HABTU & ZADOKS, 1995; SILLERO *et al.*, 2006).

4.4 Indução de resistência

As plantas possuem complexos mecanismos de defesa aos parasitas. Alguns desses mecanismos são constitutivos, representados por estruturas físicas como camada de ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, e também por substâncias químicas como os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fitoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005). Por outro lado, existem mecanismos de defesa que são ativados após o reconhecimento do agente agressor pelo hospedeiro. Esses mecanismos podem envolver a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça e formação de tiloses, além da síntese de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies ativas de oxigênio (KIRALY *et al.*, 2007).

A indução de resistência nas plantas é um fenômeno que pode ser explicado pelo aumento das respostas de defesa local e/ou sistêmica por meio de agentes externos (bióticos ou abióticos), denominados elicitores ou indutores. Os indutores caracterizam-se por atuarem de maneira não específica, ativando vários mecanismos de defesa da planta (STADNIK & MARASCHIN, 2004). Alguns organismos fitopatogênicos ativos ou inativados, raças avirulentas de patógenos e organismos não fitopagênicos, bem como seus metabólitos, têm sido relatados como potenciais indutores de origem biótica (XUE *et al.*, 1998; YUEN *et al.*, 2001; STADNIK *et al.*, 2003; DI PIERO *et al.*, 2006).

Os mecanismos de ação resultam da expressão, no momento adequado, de genes relacionados à síntese e ao acúmulo de substâncias que evitam ou atrasam a penetração do patógeno para o interior dos tecidos e a subsequente redução de suas atividades na planta hospedeira. Os mecanismos bioquímicos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas-chave no metabolismo primário e secundário da planta (STADNIK & MARASCHIN, 2004).

4.5 Peroxidases

As peroxidases são enzimas encontradas no tecido celular de animais, plantas e microrganismos. Elas catalisam a oxiredução entre o peróxido de hidrogênio e outros redutores, estimuladas por variações ambientais, fermentos e reações infecciosas (LEHNINGER, 2004). As peroxidases também participam na lignificação, suberização e

metabolismo da parede celular. Dentro das diversas famílias vegetais, existe uma grande variedade de isoformas que reagem sobre vários substratos o que dificulta o estudo mais detalhado sob sua forma de atuação (SEEVERS *et al.*, 1971; QUIROGA *et al.*, 2000; PASSARDI, 2005).

Segundo VAN LOON *et al.* (2006) as peroxidases são classificadas como proteínas relacionadas à defesa induzida (Proteínas PR) pertencentes à família PR-9. O desenvolvimento da indução de resistência em plantas é inicialmente desencadeado pela presença de espécies ativas de oxigênio, que são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas na via metabólica de transformação do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O). Dentre as várias funções das espécies ativas de oxigênio na defesa vegetal, pode ser citado o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio diretamente sobre o patógeno, dependendo da sua concentração no sítio de infecção. O peróxido de hidrogênio também atua como sinalizador por causa da sua vida relativamente longa e alta permeabilidade através das membranas, e por ativar uma enzima responsável pela conversão do ácido benzóico em ácido salicílico, que é um composto que participa das rotas metabólicas que conduzem à ativação de genes de defesa (RESENDE *et al.*, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2005).

Elas catalizam a oxidação e eventual polimerização de álcool hidrocínâmico, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), originando a lignina, que juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que se acumulam na parede celular das células vegetais, funcionam como uma barreira física à penetração fúngica (STADNIK & BUCHENAUER, 2000).

Estudos histoquímicos e citoquímicos realizados por IRITI & FAORO (2003) mostraram o acúmulo de H_2O_2 nas paredes celulares de células epidérmicas de folhas de feijoeiro 48 horas após o tratamento com o Acibenzolar-S-metil (ASM), um indutor de resistência disponível comercialmente. O tratamento com ASM conduziu ao fortalecimento da parede das células da epiderme das folhas, limitando a colonização pelo fungo *U. appendiculatus*.

4.6 Glucanases

Uma outra resposta de defesa das plantas envolve a síntese de enzimas líticas, como as glucanases, que são enzimas que produzem oligômeros com 2 a 6 unidades de glicose a partir da β -1,3 glucana que juntamente com a quitina, são componentes da parede celular dos fungos (JONGEDIJK *et al.*, 1995). A enzima é encontrada em várias plantas, fungos e bactérias (MARKOVICH & KONONOVA, 2003).

Estudos indicam que as glucanases possuem uma relação direta na defesa das plantas, atuando sinergisticamente com as quitinases sobre a parede celular do patógeno. Os oligossacarídeos resultantes da lise da parede celular, tanto do patógeno, quanto do hospedeiro, os quais podem ativar outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência, como a produção de fitoalexinas (CUTT & KLESSIG, 1992).

O acúmulo de β -1,3 glucanas entre a membrana plasmática e a parede celular está relacionado à formação de halos e papilas, que são importantes estruturas físicas de defesa (KANG *et al.*, 2003). A proteção de plântulas estioladas de feijoeiro contra *Rhizoctonia solani* (Kuhn) e *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cavara foi

associada ao aumento da atividade de glucanases induzida por uma cepa de *Rhizoctonia* binucleada não fitopatogênica (XUE *et al.*, 1998).

4.7 A macroalga *Ulva fasciata*

A alga *Ulva fasciata* (Delile) é uma macroalga marinha do filo *Chlorophyta*, com talo achatado e irregularmente lobado, de cor predominantemente verde, que se fixa nos costões rochosos através de um pequeno apressório. Microscopicamente, o talo apresenta apenas uma camada de células retangulares que caracterizam o gênero (BÖKER-TÔRRES, 2005). Essa alga pode ser encontrada em praticamente todo o litoral brasileiro, desde águas rasas com exposição de ondas até 10 metros de profundidade. É potencialmente dominante em ambientes eutrofizados de baixa salinidade causado pelo aporte de água doce (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

WOSNITZA & BARRANTES (2005) descrevem a utilização do pó de *Ulva* sp. como condicionador de plantas após o processo de compostagem como alternativa para a utilização da biomassa de algas deste gênero que acumulam-se em áreas eutrofizadas na baía de Paracas no Peru. No Brasil OLIVEIRA FILHO (1981), citado por OLIVEIRA *et al.* (2005), relatou a utilização de algas dos gêneros *Ulva* C. Agardh e *Enteromorpha* Link como adubo, por agricultores da região de Rio Grande (RS). GESTINARI *et al.* (2002) observaram que a utilização do pó das algas dos gêneros *Ulva* spp. e *Sargassum* C. Agardh incorporadas no solo ou areia promoveu efeito benéfico sobre o desenvolvimento de plantas de cebolinha (*Allium schoenoprasum* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e salsa (*Petroselinum crispum* P. Miller).

As algas marinhas do gênero *Ulva* possuem diversos compostos químicos de grande interesse para as indústrias de alimentos (RAYMUNDO, 2004), cosméticos (GARCÍA *et al.*, 2002) e produtos farmacêuticos (PENGZHAN *et al.*, 2003) e agrícolas (STADNIK & PAULERT 2008).

4.8 Ulvana

A ulvana é um polissacarídeo sulfatado solúvel em água encontrado na parede celular de algas do gênero *Ulva* spp., cerca de 38 a 52 % do peso seco da alga são representados por polissacarídeos (LAHAYE & ROBIC, 2007). QUEMENER *et al.*, 1997; PENGZHAN *et al.*, 2003 e PAULERT, 2005 demonstraram que sulfato, ramnose, xilose, e ácido glicourônico são os principais constituintes da ulvana. A molécula é composta estruturalmente por unidades repetidas de ácido ulvanobiurônico-3-sulfato [$\rightarrow 4$]- β -GlcP_A-($1 \rightarrow \alpha 4$)- α -Rhap($1 \rightarrow$).

Diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos da aplicação de polissacarídeos obtidos de algas marinhas na ativação de mecanismos de resistência de plantas contra patógenos. O tratamento de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) com o polissacarídeo laminarina, uma β -1,3 glucana extraída da alga marrom *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour, elicitou respostas de defesa contra a bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey *et al.* (KLARZYNSKI *et al.*, 2000), a laminarina quando aplicada sobre plantas de videira (*Vitis vinifera* L.) induziu respostas de resistência que reduziram em 55% e 75% a infecção contra os patógenos *Botrytis cinerea* (Pers.) e *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis), respectivamente (AZIZ *et al.*, 2003).

Entretanto, MERCIER *et al.* 2001 não verificaram a expressão de genes de defesa em plantas de fumo utilizando a laminarina. Porém, quando se utilizou o polissacarídeo algal sulfatado carragena, obtido das algas vermelhas *Gigartina acicularis* (Roth) Lamourou e *Gigartina pistilla* (Gmelin), verificou-se a ativação dos genes de defesa semelhante ao tratamento com o elicitor biótico *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker.

CLUZET *et al.*, (2004) observaram que o tratamento com ulvana pode elicitar a expressão de genes relacionados à defesa em plantas de *Medicago truncatula* L. contra o patógeno *Colletotrichum trifolii* (Bain. Ess.). A pulverização de ulvana reduziu local e sistemicamente cerca de 65 % a severidade da mancha foliar de *Glomerella* em plântulas de maçã cv Gala, quando aplicado 6 dias antes da inoculação com o fungo *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (ARAÚJO *et al.*, 2008) demonstrando o potencial da ulvana como possível indutor de resistência a doenças de plantas.

Em feijoeiro, PAULERT (2005) verificou que duas aplicações consecutivas de ulvana reduziram a severidade da antracnose, doença causada pelo fungo *C. lindemuthianum*. Analisando o mesmo patossistema, FERNANDES (2007) observou que o tratamento com ulvana reduziu local e sistemicamente o número e o desenvolvimento de lesões do fungo nas cultivares de feijoeiro suscetíveis à antracnose IPR Uirapuru e Mouro Graúdo.

5. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE CULTIVARES DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) À FERRUGEM.

INTRODUÇÃO

A ferrugem do feijoeiro causada pelo fungo *U. appendiculatus*, é uma doença que ocorre em todas as regiões produtoras do mundo. No Brasil a ferrugem representa um problema de importância econômica em quase todas as regiões de cultivo do feijoeiro, causando danos variáveis no rendimento dos grãos.

A utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controle da ferrugem, entretanto o trabalho de melhoramento genético visando obter cultivares resistentes é bastante dificultado em função da alta variabilidade do patógeno, que apresenta inúmeras raças fisiológicas. A caracterização dos componentes de resistência parcial como: a quantidade e tamanho das pústulas, período de latência e o progresso da doença ao longo do cultivo são estratégias para a obtenção de resistência estável e duradoura.

Nessa etapa do trabalho objetivou-se testar em condições de casa-de-vegetação 37 cultivares comerciais, crioulas e linhagens de feijoeiro comum quanto a resistência à ferrugem através da quantificação dos componentes quantitativos de resistência. Por fim, para a caracterização da reação de resistência dos genótipos os componentes de resistência avaliados foram comparados em porcentagem em relação ao padrão moderadamente suscetível (cv. Pérola) e analisados por meio do teste de agrupamento de médias Scott Knott (5%).

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos na casa-de-vegetação e no Laboratório de Fitopatologia, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

5.1.1 Condições de cultivo

As plantas foram cultivadas em condições de casa-de-vegetação no período de maio a agosto de 2007 (Tabela 1).

Tabela 1. Temperaturas mínimas, máximas e as médias mensais na casa-de-vegetação durante a realização dos experimentos.

Mês	Temperatura mensal (° C)		
	Mínima	Máxima	Média
Maio	14	23	18
Junho	10	23	16
Julho	9	22	15
Agosto	11	22	16
Setembro	13	25	19
Outubro	15	31	23
Novembro	16	30	23
Dezembro	17	32	24

Os 37 genótipos de *P. vulgaris* avaliados constituíram-se de três grupos: cultivares comerciais, cultivares crioulas e linhagens (Tabela 2) que estavam armazenadas no Banco de Germoplasma da Escola Agrotécnica Federal de Rio do Sul (EAFRS) – SC e foram sedidas pelo pesquisador da EPAGRI João A. Wordell Filho semeadura distribuíram. As sementes foram armazenadas a -20 ° C até o seu uso. Na -se

equidistantemente oito sementes em cada vaso plástico preto n° 3 (Plasticofer Ltda.) contendo 2 kg de mistura homogênea (v/v) de solo argiloso (75%) e composto orgânico (25%). Estas sementes foram cobertas com aproximadamente 2,5 cm de solo argiloso. Decorridos 7 dias após a emergência das plântulas, foi realizado um desbaste, deixando-se três plantas por vaso. Cerca de 3 dias após o desbaste, fez-se uma adubação com solução de uréia (0,05 g/L) adicionando-se 50 mL da solução em cada vaso, fornecendo 35 µg de N/Kg de solo.

Para a prevenção contra o oídio do feijoeiro (*Erysiphe polygoni* DC), pulverizou-se semanalmente, antes da inoculação, solução de enxofre 80% PM (0,3 g/L, Ambiens, Salvador). Os vasos foram irrigados conforme a necessidade hídrica das plantas e casualizados periodicamente.

5.1.2 Obtenção e manutenção do inóculo

O isolado MANE (Micoteca Anne-Lore Schroeder – CCA – UFSC) - 4 de *U. appendiculatus* foi obtido de lavoura comercial de feijoeiro da região do Alto Vale do Itajaí – SC (MARTINS, 2005). O inóculo foi mantido e multiplicado em feijoeiro cv. Pérola por meio de inoculações periódicas de plantas jovens com suspensão de uredósporos do fungo.

Tabela 2. Classe comercial, grupo e número do acesso no Banco de Germoplasma da EAFRS, conforme as cultivares de feijoeiro testadas quanto à resistência à ferrugem.

Cultivar	Classe comercial	Grupo	nº. do acesso
BR IPA-11 Brígida	carioca	Comercial	9
Tahyu	rosinha	Comercial	48
Rudá	carioca	Comercial	56
FT Paulistinha	carioca	Comercial	57
IPR Juriti	carioca	Comercial	128
Carioca	carioca	Comercial	139
FT Soberano	preto	Comercial	152
BRS Valente	preto	Comercial	162
IPR Uirapuru	preto	Comercial	166
SCS 202 Guará	carioca	Comercial	177
CF 49	carioca	Crioula	89
CF 68	preto	Crioula	100
CF 69 Caibi	manteiga	Crioula	101
CF 73 Piratuba	rajado	Crioula	105
CF 128 Aberlardo Luz	preto	Crioula	109
Sogro/Daniel	preto	Crioula	172
Becker - Bela Vista	preto	Crioula	182
Ivo Risolis Wittimarsum	rajado	Crioula	183
FT 9901	carioca	Linhagem	49
FT 991159	preto	Linhagem	51
TB 9401	preto	Linhagem	52
FT 84113	preto	Linhagem	53
MD 841	preto	Linhagem	55
CHC 90-1535	carioca	Linhagem	124
LH 11	carioca	Linhagem	125
CHC 9713	carioca	Linhagem	129
LP 97-04	carioca	Linhagem	140
VI 4599	carioca	Linhagem	141
CHC 97-29	carioca	Linhagem	143
FT 91-1249	carioca	Linhagem	144
CHC 9703	carioca	Linhagem	145
SEL. CP9310635	preto	Linhagem	146
AL 9021332	preto	Linhagem	149
CI 96712V	preto	Linhagem	150
LP 98-05	preto	Linhagem	157
FT 84-113	preto	Linhagem	160
CHP 97-04	preto	Linhagem	167

5.1.3 Inoculação das plantas

Os uredósporos foram removidos das pústulas para um copo de Becker de vidro (500 mL) com o auxílio de um pincel nº 2 e, logo em seguida, suspensos em água destilada estéril, adicionando-se Tween 20 (0,05%). O inóculo foi quantificado em câmara de Neubauer e calibrado para a concentração de 10^6 uredósporos/mL, por meio das diluições necessárias.

Ao atingirem o estágio fenológico V₃ (Tabela 3), as plantas foram inoculadas artificialmente com uma suspensão de uredósporos de *U. appendiculatus*, utilizando-se pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58 psi, bico 0,7 mm de diâmetro, marca Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (Schulz, Brasil; pressão 25 lbf/pol²; potência 180 W; vazão de 20 mL/min). Após a aspersão de um volume aproximadamente de 2 mL/planta, os vasos foram acondicionadas em condições de câmara úmida por 48 horas. Findo este período, as plantas foram transferidas para as bancadas da casa-de-vegetação, onde permaneceram até a avaliação do experimento.

Tabela 3. Descrição e evolução dos estádios fenológicos vegetativos para o feijoeiro, cultivado em condições de casa-de-vegetação

Estádio*	Tempo (dias após a sementeira)	Descrição
V ₀	2	Germinação de 50% das sementes.
V ₁	4	Folhas cotiledonares de 50% das plantas ao nível do solo
V ₂	7	Folhas primárias de 50% das plantas completamente expandidas
V ₃	12	Folhas trifoliadas de 50% das plantas completamente expandidas
V ₄	18	Segunda Folhas trifoliadas de 50% das plantas completamente expandidas

*Adaptado de FANCELLI & DOURADO NETO (1997).

5.1.4 Determinação do período de incubação (PI), período de latência(PL) e número de pústulas (NP)

Para verificação do período de incubação e de latência, as primeiras folhas trifolioladas das plantas foram examinadas diariamente, a fim de observar o desenvolvimento dos primeiros sintomas da doença e formação das pústulas. Nesse trabalho o período de incubação foi definido como sendo o intervalo de tempo (dias) entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas e o período de latência foi considerado como sendo o intervalo de dias entre a inoculação e a esporulação visível de 50% das pústulas conforme PARLEVLIET, 1979.

Aos 15 dias após a inoculação, foi efetuada a contagem do número de pústulas em toda a área do primeiro trifólio de cada planta, com auxílio de contador manual. Após a contagem e a retirada das seções foliares para a determinação do diâmetro de pústulas, todos os primeiros trifólios foram destacados e, imediatamente prensados e herbarizados. A área total de cada trifólio foi determinada por meio do medidor de área foliar portátil Área Meter (modelo AM 300, ADC Bioscientific, Inglaterra).

5.1.5 Determinação do diâmetro de pústulas (DP)

Para a determinação do diâmetro das pústulas, uma seção foliar (3 x 4 mm) contendo uma pústula foi retirada do primeiro trifólio de cada uma das plantas da repetição, 15 dias após a inoculação. As seções foliares foram colocadas em microtubos contendo 1 mL de solução de ácido acético glacial (3:1), para a fixação, retirada da clorofila do tecido

e conservação por no máximo 48 horas. Em seguida, as seções foram montadas individualmente em glicerina em lâminas de vidro e o diâmetro da pústula foi determinado com o auxílio de microscópio óptico (StudarLab. PZO, Polônia), equipado com ocular micrométrica sob aumento de 125x.

5.1.6 Índice de doença (ID)

Para a obtenção do índice de doença, o número médio de pústulas por centímetro quadrado de cada repetição, foi convertido em porcentagem em relação ao número de pústulas da cv. Pérola (PRP) em cada experimento. Paralelamente, o diâmetro médio de pústula de cada repetição foi convertido em notas, de acordo com a escala descrita na Tabela 4. O índice de doença (ID) foi calculado com a seguinte fórmula: $ID = (PRP \times DP) \times 100 / PRP_{m\acute{a}x.} \times DP_{m\acute{a}x.}$ Onde: PRP = Porcentagem em relação ao padrão; DP = diâmetro da Pústula (nota); $PRP_{m\acute{a}x.}$ = valor máximo da porcentagem em relação ao padrão no respectivo experimento e $DP_{m\acute{a}x.}$ = valor máximo do diâmetro de pústula verificado no respectivo experimento. Por meio do teste Scott Knott (5%), (Anexo 5), estabeleceram-se os intervalos de classes para grupos de resistência de acordo com os valores do ID em cada experimento.

Tabela 4. Descrição da escala de notas (tipo de pústula) segundo STAVELY *et al.*, 1983.

Escala	Descrição
1	Ausência de sintomas (imune)
2	Manchas necróticas sem esporulação
3	Pústulas esporulando com diâmetro < 300 µm
4	Pústulas esporulando com diâmetro de 300 µm a 500 µm
5	Pústulas esporulando com diâmetro de 500 µm a 800 µm
6	Pústulas esporulando com diâmetro >800 µm

5.1.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Devido às limitações do espaço físico na câmara úmida foram realizados cinco experimentos independentes, incluindo-se sempre a cv. Pérola que serviu como padrão moderadamente suscetível (PMS). Foi utilizado o delineamento experimental completamente casualizado composto por sete repetições (vasos com três plantas). Para as análises, os valores do Número de pústulas (NP), Diâmetro de pústulas (DP), Índice de doença (ID), foram convertidos em porcentagem em relação ao padrão moderadamente suscetível (cv. Pérola). Verificou-se a homogeneidade das variâncias através do teste de Levene. Em seguida, de acordo com a necessidade, foi realizada a transformação dos dados para $\sqrt{(x+1)}$ ou $\log(x+1)$.

Os dados foram submetidos à análise de variância e, após a verificação da significância, foi aplicado o teste de agrupamento de médias Scott Knott a 5% de probabilidade para a classificação dos grupos de resistência. Para as análises de correlação e de variância foi utilizado software Statistica 6.0 (Statsoft®, EUA). O teste de agrupamento de médias Scott Knott foi calculado através do software Sisvar (UFLA).

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Número de pústulas (NP)

O número de pústulas verificado no primeiro trifólio da cv. Pérola que serviu como padrão moderadamente suscetível (PMS), variou de 0,1 a 2,2 pústulas/cm² (Anexo 1). Comparado ao cultivar padrão moderadamente suscetível (PMS), o número de pústulas foi significativamente menor em apenas cinco cultivares, entre elas, a cv. BR IPA - 11 Brígida, ilustrada na Figura 1 A. Nessas cultivares, o número de pústulas foi de 15,2 a 52,4% menor que o PMS (Tabela 5). As linhagens FT 991159 e FT 84-113 apresentaram imunidade à doença, não havendo a formação de nenhuma pústula.

Ainda quanto ao número de pústulas, 18 cultivares (aprox. 50%), apresentaram valores estatisticamente semelhantes ao PMS, nove cultivares foram mais suscetíveis do que o PMS, e três cultivares altamente suscetíveis à ferrugem apresentando cinco vezes mais pústulas que o PMS (Tabela 5; Anexo 5).

5.2.2 Diâmetro de pústulas (DP)

Os diâmetros médios de pústulas nas 35 cultivares apresentaram médias que variaram de 158 µm a 590 µm (Anexo 1), ou seja, de 45,2% a 124,4% em relação ao PMS, respectivamente (Tabela 5). Na cultivar utilizada como PMS, o DP variou de 347 µm a 475 µm.

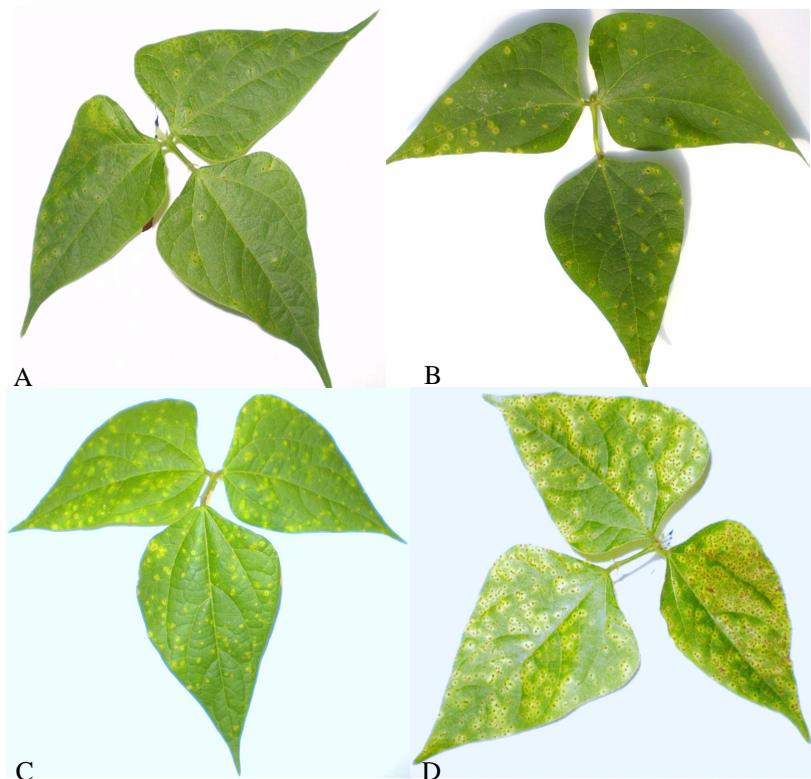


Figura 1. Grupos de resistência à ferrugem do feijoeiro de acordo com o índice de doença (ID): (A) cv. BR IPA -11 Brígida – Resistente (ID = 16%); (B) cv. Pérola – Moderadamente Suscetível (ID = 100%); (C) cv. CHP 97-04 – suscetível (ID = 260%) e (D) cv. SCS 202 Guará – altamente suscetível (ID = 371,8%).

A análise de variância detectou diferença significativa entre os valores do DP (Anexo 3). O maior DP foi encontrado na cultivar SCS 202 Guará (590 μm) mostrado na Figura 1D, que quando comparado ao PMS mostrou-se significativamente superior através do teste Scott Knott

($p < 0,05$). Foram observados pontos necróticos na linhagem FT 91-1249 (Figura 2). As cultivares que apresentaram DP abaixo de 76,5% em relação ao PMS foram estatisticamente inferiores (Anexo 6).



Figura 2. Pontos necróticos em folíolo de feijoeiro cv. FT 91-1249, aos 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

5.2.3 Reação de resistência com base no índice de doença (ID)

A análise pelo teste de agrupamento Scott Knott das cultivares de feijoeiro, baseado na porcentagem ID em relação ao PMS, permitiu a classificação de cinco grupos de resistência à ferrugem do feijoeiro: imune, resistente, moderadamente suscetível, suscetível e altamente suscetível (Tabela 5). Os valores de ID para o PMS variaram de 6,5 a 22,5. Das 37 cultivares, seis obtiveram ID inferior ao PMS. Metade das cultivares (19 genótipos) foram classificados como semelhante ao PMS quanto à reação de resistência à ferrugem. Seis genótipos apresentaram valores de ID superiores ao PMS e foram considerados suscetíveis e 4 genótipos apresentaram o ID maior que o grupo suscetível e foram considerados altamente suscetíveis (Anexo 7).

Tabela 5. Período de latência (PL), número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²), diâmetro de pústulas (DP), índice de doença (ID) em relação ao PMS e reação de resistência à ferrugem de 37 cultivares comerciais, crioulos e linhagens de feijoeiro, 15 dias após a inoculação com *U. appendiculatus*.

Genótipos	Experimento	PL (dias)	% em relação ao PMS			Reação ^e
			NP ^a	DP ^b (nota) ^c	ID ^d	
FT 991159	2	-	0	0 (1)	0	I
FT 84-113	4	-	0	0 (1)	0	I
AL 9021332	1	12	15,2*	52,4 (3,5)*	6,3*	R
BR IPA-11 Brígida	2	11	28,7*	53,0 (3,6)*	16,1*	R
Ivo Risolis Wittmarsum	2	11	21,0*	57,0 (3,6)*	25,0*	R
FT 91-1249	5	11	85,0	43,7 (2,0)*	41,2*	R
MD 841	3	11	52,4*	45,2 (3,5)*	44,9*	R
CF 128 Abelardo Luz	1	11	47,4*	86,0 (3,0)	45,2*	R
BRS Valente	1	11	174,5	90,6 (4,0)	60,2	MS
SEL. CP9310635	3	11	93,2	58,1 (3,6)*	79,8	MS
CHC 9703	5	11	111,5	65,2 (4,0)*	92,8	MS
CF 68	5	11	107,6	76,5 (4,3)*	96,4	MS
FT Soberano	3	11	108,7	70,0 (3,8)*	98,2	MS
FT 9901	1	11	276,4*	97,3 (4,2)	100,0	MS
Rudá	3	11	128,5	64,2 (3,7)*	113,2	MS
CF 69 Caibi	3	12	136,7	80,3 (3,9)	127,0	MS
CF 73 Piratuba	3	11	131,5	92,0 (4,1)	128,4	MS
TB 9401	5	11	167,0	50,0 (3,7)*	128,8	MS
FT Paulistinha	1	11	261,3*	101,4 (4,2)	132,4	MS
CI 96712V	3	11	170,3	64,8 (3,7)*	150,1	MS
VI 4599	5	11	132,7	100,8 (4,8)	154,8	MS
Carioca	4	12	217,7	66,6 (3,8)*	161,2	MS
LH 11	4	11	201,7	93,4 (4,3)	169,2	MS
CHC 9713	4	12	197,0	103,5 (4,5)	173,0	MS
CHC 97-29	1	11	188,0	114,0 (4,5)	173,0	MS
FT 84113	3	11	155,3	109,5 (4,7)	174,0	MS
Becker Bela Vista	1	11	126,4	96,0 (4,1)	180,0	MS
IPR Juriti	4	11	296,4*	94,0 (4,3)	248,3*	S
CHP 97-04	4	11	318,0*	86,3 (4,2)	260,0*	S
CHC 90-1535	3	12	245,1*	115,6 (4,5)	262,8*	S
Sogro Daniel	5	12	243,2*	121,4 (5,2)*	263,4*	S
IPR Uirapuru	5	11	253,4*	111,0 (5,0)	278,7*	S
LP 98-05	4	11	297,0*	98,8 (4,4)	297,0*	S
SCS 202 Guará	5	11	336,8*	124,4 (5,3)*	371,8**	AS
CF 49	4	12	550,0**	105,5 (4,8)	514,2**	AS
Tahyu	4	11	632,2**	97,5 (4,4)	608,0**	AS
LP 97-04	2	11	692,4**	93,2 (4,4)	630,2**	AS

* indica diferença significativa em relação ao PMS, de acordo com o teste de agrupamento de médias (Scott Knott, $P \leq 0,05$).

** indica diferença significativa em relação ao grupo suscetível (S) de acordo com o teste de agrupamento de médias (Scott Knott, $P \leq 0,05$).

^a número de pústulas por centímetro quadrado do PMS = 1,4; 0,1; 2,2; 0,6 e 1,4 para os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

^b diâmetro médio das pústulas do PMS = 352 (4,2); 347 (4,2); 350 (4,2); 393 (4,4) e 475(4,8) para os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

^c Escala: 1=ausência de sintomas; 2=manchas necróticas sem esporulação; 3= pústulas com diâmetro $< 300 \mu\text{m}$; 4= pústulas com diâmetro de 300 a $500 \mu\text{m}$; 5= pústulas com diâmetro de 500 a $800 \mu\text{m}$.

^d valores de ID do PMS = 22,4; 7,0; 22,5; 6,5 e 15,1 para os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

^e Reações classificadas de acordo com o ID: I = imune, R = resistente, MS = moderadamente suscetível, S = suscetível e AS = altamente suscetível.

5.2.4 Período de latência e de incubação

O período de incubação da doença nas diferentes cultivares variou pouco, sendo que na maioria, cerca de 80% (30 cultivares), os primeiros sintomas foram observados em 9 dias após a inoculação. No restante, os sintomas foram observados 10 dias após a inoculação (Tabela 5). Em todas as cultivares, o período de latência foi de 2 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas.

5.2.5 Correlação entre os componentes de resistência

Foram estabelecidas correlações entre diâmetro de pústula, número de pústulas, índice de doença, e período de latência de cada cultivar entre si (Tabela 6). A correlação mais alta foi verificada entre o ID e o NP. Entretanto a análise da correlação entre o PL e os outros componentes foi baixa, destacando-se apenas a correlação entre o DP.

Tabela 6. Análise de correlação entre os componentes de resistência das diferentes cultivares de *P. vulgaris* à ferrugem do feijoeiro.

1	Variável ¹	Coefficiente de correlação (r)
	DP x NP	0,57 *
	ID x NP	0,96 **
	ID x DP	0,59 *
	PL x NP	0,30 ns
	PL x DP	0,67*
	PL x ID	0,29 ns

DP= Diâmetro de pústula; NP = Número de pústulas; ID = Índice de doença e PL = Período de latência.

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

ns: não significativo.

5.3 DISCUSSÃO

A resistência parcial resulta na redução da taxa de desenvolvimento da doença, através da ação combinada dos componentes que a condicionam, como o maior período de latência, pústulas de tamanho restrito e poucas pústulas por cm² de área foliar (OHM & SHANER, 1976; PARLEVLIET, 1979). De acordo com SILLERO *et al.* (2006), muitas das reações de resistência à ferrugem em leguminosas são do tipo incompleta. O termo incompleta aplica-se aos casos em que o hospedeiro é menos afetado pelo patógeno que o controle suscetível, mas sem a prevenção completa do desenvolvimento e reprodução do patógeno. A resistência quantitativa no patossistema ferrugem do feijoeiro já foi evidenciada por diferentes autores (STATLER & MCVEY, 1987; MMBAGA & STEADMAN, 1992; HABTU & ZADOKS, 1995; FALEIRO *et al.*, 1999; OCHOA *et al.*, 2007) e vem sendo manipulada continuamente em programas de melhoramento a essa doença.

Para que a resistência parcial possa ser identificada e caracterizada em um grupo de genótipos, é necessário que exista variabilidade entre os componentes acima citados. Assim, no presente trabalho, verificou-se a variabilidade da maioria dos componentes de resistência avaliados nos 37 genótipos de feijoeiro, o que permitiu separar grupos de resistência através da sua quantificação. Curiosamente, o período de latência (11 dias) manteve-se invariável em todos os experimentos (Tabela 5). Segundo PARLEVLIET (1979), um longo período de latência está relacionado com uma maior resistência da planta à colonização do patógeno, o que ocasiona um menor número de

ciclos da doença, reduzindo a severidade durante o ciclo de cultivo. No presente trabalho, não foi observada variação em relação aos cultivares de feijoeiro e o período de latência em concordância com STATLER & MCVEY, (1987), que analisaram a resistência parcial de cinco cultivares de feijoeiro e encontraram que o período de latência não variou significativamente entre as cultivares resistentes e suscetíveis à ferrugem. Entretanto, diversos trabalhos (HABTU & ZADOKS, 1995; MMBAGA *et al.*, 1996; RIOS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001) mencionam a importância do aumento do período de latência como componente da resistência parcial no patossistema ferrugem do feijoeiro.

O número e o tamanho das pústulas refletem a resistência da planta à colonização e à multiplicação do patógeno. Com exceção das linhagens FT 991159 e FT 84-113, que apresentaram imunidade ao isolado MANE - 4 de *U. appendiculatus* utilizado, os diversos genótipos de feijoeiro avaliados apresentaram alta variabilidade quanto ao número de pústulas/cm² e ao diâmetro das pústulas. Nesse estudo, a maioria dos genótipos apresentaram o NP semelhante ao padrão moderadamente suscetível (Tabela 5), independente da classe comercial ou do grupo, demonstrando que a resistência não é restrita a algum grupo particular.

Considerando as cultivares comerciais incluídas na identificação de resistência ao isolado MANE - 4 de ferrugem houve discrepâncias entre os resultados encontrados nesse trabalho e aqueles descritos por outros autores (FALEIRO *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2001; RAGAGNIN *et al.*, 2003). Dentre os dez genótipos do grupo comercial, apenas a cv. BR IPA -11 Brígida apresentou maior resistência que o cv. Pérola, isto é, tanto o NP quanto o DP foram menores significativamente

em BR IPA -11 Brígida que no PMS (Tabela 5). Em contraste, a cv. Tahyu, do grupo comercial Rosinha, que é conhecido como suscetível à ferrugem (RIOS, 1994; BASSANEZI et al., 1998) e utilizada para a multiplicação de inóculo SILVA *et al.* (2001).

MODA-CIRINO *et al.*, 2003 comentam sobre a resistência da cv. IPR Juriti, do mesmo modo, a cv. SCS 202 Guará foi descrita como resistente à ferrugem (ELIAS *et al.*, 2003), fato não observado no presente trabalho. Estas variedades foram lançadas em 2003 e provavelmente devido à pouca ocorrência da doença nos estados Santa Catarina e Paraná nesse ano, essas cultivares foram classificadas como resistentes.

A caracterização de cultivares resistentes à ferrugem é dificultada em função da grande variabilidade genética do patógeno (SINGH, 2001; MIKLAS *et al.*, 2006). A variação da virulência entre cultivares de feijoeiro durante a fase assexuada do fungo foi dectada por ALEXANDER *et al.* 1985 estudando cinco gerações de *U. appendiculatus*, os quais demonstraram a existência de variabilidade mesmo em regiões onde o desenvolvimento da fase sexuada do fungo é rara ou inexistente. As constantes gerações do patógeno durante o ciclo de cultivo e o transporte dos uredósporos pelo vento permitem a introdução constante de novas raças dentro e entre as épocas e regiões de cultivo do feijoeiro (SINGH, 2001).

Entre o grupo crioulo, destaca-se o genótipo Ivo Risolis Wittmarsum, caracterizado como resistente que foi cultivado em pequena escala na região do “Alto Vale do Itajaí” de Santa Catarina, mesma região de origem do isolado de *U. appendiculatus*. O fato de alguns agricultores não utilizarem sementes comerciais para o plantio,

reutilizando as suas próprias sementes, ou as sementes do vizinho, ocasiona a seleção de cultivares adaptados às suas condições agroecológicas e sócio-econômicas que são diferentes das encontradas nos cultivos convencionais (RODRIGUES *et al.*, 2002).

Segundo STAVELY *et al.* (1989), a resistência à ferrugem do feijoeiro pode se expressar como uma lesão necrótica hipersensitiva ou como reação de imunidade ao patógeno. Este fato reforça a importância, em relação à utilização de fontes de resistência, das linhagens FT 991159 e FT 84-113 que foram imunes ao isolado de *U. appendiculatus*. Outro tipo de reação de resistência à ferrugem é uma forma de reação hipersensitiva incompleta associada com a necrose tardia dos tecidos do hospedeiro em torno da lesão do patógeno (SILLERO *et al.*, 2000), semelhante à reação observada na linhagem FT 91-1249 (Figura 2).

Em outro trabalho de resistência de diferentes cultivares à ferrugem do feijoeiro, FALEIRO *et al.*, (2001) em um estudo de 17 cultivares comerciais de feijoeiro a cinco isolados de *U. appendiculatus* em casa-de-vegetação, detectaram suscetibilidade na maioria das cultivares, sendo que os cultivares do grupo carioca Rudá apresentaram a média de 3,4 pustulas/cm² e tamanho médio de 300 a 500 µm, enquanto o cv. Pérola obteve média de 2,2 pústulas/cm² e tamanho médio de 300 a 800 µm, na folha primária. No presente trabalho, a cv. Rudá apresentou 2,8 pústulas/cm² e diâmetro médio menor que 300 µm e foram encontradas pústulas com diâmetro médio de 383 µm e a média de 1,3 pústulas/cm² no cv. Pérola (Anexo 1). Porém estes resultados são referentes ao segundo trifólio, demonstrando a possível discrepância devido ao diferente estágio de desenvolvimento da planta (IMHOFF *et al.*, 1981). RAGAGNIN *et al.*, (2003) e SILVA *et al.*, (2001) também

citam o cv. Rudá como resistente à ferrugem.

Com base nos componentes relacionados com a severidade da doença (NP e DP) em relação ao padrão cv. Pérola foi calculado o ID que permitiu o agrupamento dos genótipos em resistentes (R), moderadamente suscetível (MS), suscetíveis (S) e altamente suscetíveis (AS) mostrados na Tabela 5.

As cultivares resistentes selecionadas devem ser avaliadas a campo, pois a influência das adversidades climáticas e a mistura de raças de *U. appendiculatus* que frequentemente ocorrem nestas condições podem alterar o desempenho da resistência. Outros fatores como produção de uredósporos (número de uredósporos produzidos por pústulas por dia) ou a duração da esporulação (número de dias de produção de uredósporos) são importantes componentes de resistência (SILLERO *et al.*, 2006).

6. MECANISMOS DE DEFESA ELICITADOS POR ULVANA CONTRA *Uromyces appendiculatus*.

INTRODUÇÃO

O fenômeno do aumento do nível de resistência devido à rápida expressão de diferentes genes de defesa do hospedeiro utilizando-se substâncias de origem bióticas ou abióticas é conhecido como indução de resistência. Como consequência, verifica-se a redução do número e tamanho das lesões do patógeno, assim como prejuízo à reprodução do agente causal através de mecanismos físicos e/ou bioquímicos da planta que evitam ou atrasam o desenvolvimento do mesmo.

Alguns polissacarídeos derivados de algas, a exemplo da ulvana, têm sido relatados como potenciais indutores de resistência em plantas, ativando genes relacionados a proteínas de defesa.

Nesta parte do trabalho, procurou-se investigar o efeito da pulverização da ulvana nos mecanismos de defesa de três cultivares de feijoeiro do grupo comercial carioca com diferentes níveis de resistência à ferrugem do feijoeiro. Para tanto, foram efetuadas avaliações microscópicas e determinadas as atividades de peroxidases e glucanases na primeira folha trifoliolada das cultivares 48 horas após a inoculação de *Uromyces appendiculatus*.

6.1. MATERIAL E MÈTODOS

6.1.1 Obtenção da ulvana a partir da alga *Ulva fasciata*

As amostras da alga *U. fasciata* foram coletadas manualmente em janeiro de 2007 nos costões rochosos da praia da Armação (latitude: 27° 44' 53,7" S; longitude: 48° 29' 55,6"), Florianópolis, Santa Catarina), acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Fitopatologia, onde foram lavadas em água corrente para a retirada dos resíduos de areia, sal e outras algas. Após o escoamento da água em excesso, o material foi colocado em estufa a 50° C durante 48 horas. Após a secagem completa, o material foi triturado até a obtenção de um pó, o qual foi armazenado a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração do polissacarídeo. A amostra de alga *U. fasciata* e o polissacarídeo ulvana foram registrados no Laboratório de fitopatologia com o número de coleta 67. A exsicata da alga foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná sob o código UPCB 61313.

Para obtenção da ulvana 10g do pó da alga seca foram adicionados em 100 mL de água destilada. A mistura foi autoclavada por uma hora (121° C e pressão de 1,5 kg/cm²) e filtrada em uma dupla camada de pano de algodão branco (22 x 19 cm). O polissacarídeo foi precipitado com três volumes de etanol 98 GL e armazenado a -20 °C por 48 horas. Após este período, o líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi seco em estufa a 50° C durante aproximadamente 50 horas. O polissacarídeo obtido foi armazenado a $6^{\circ} \pm 2 \text{ C}$ até o momento do uso.

6.1.2 Cultivo, tratamento, inoculação, avaliação do número de pústulas/cm² e diâmetro das pústulas.

As cultivares do grupo comercial carioca BR IPA - 11 Brígida (resistente), IPR Juriti (suscetível) e Pérola (padrão moderadamente suscetível) foram usadas para avaliar o efeito da pulverização com ulvana na resistência contra *U. appendiculatus*. As plantas foram cultivadas no período de setembro a outubro de 2007 (Tabela 1) em casa-de-vegetação e inoculadas conforme descrito nos itens 5.1.1 e 5.1.3, respectivamente.

A ulvana foi dissolvida completamente em água destilada sob agitação em temperatura ambiente, na concentração de 10 mg/mL. Para a pulverização, utilizou-se pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58 psi, bico 0,7 mm de diâmetro, vasão de 20 mL/min marca Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (Schulz, Brasil; pressão 25 lbf/pol² e potência 180 W). As plantas foram pulverizadas com ulvana 3 e 6 dias antes da inoculação. As plantas testemunhas receberam água destilada, 3 e 6 dias antes da inoculação. Foram utilizados cerca de 1,5 mL de solução de ulvana e de água destilada por planta.

A determinação do número de pústulas/cm² e do diâmetro das pústulas foram efetuados semelhante aos itens 5.1.4 e 5.15, respectivamente.

6.1.3 Análises microscópicas

Para análise microscópica da germinação e verificação das estruturas de infecção de *U. appendiculatus* 48 horas após a inoculação, foram coletados com auxílio de um furador de rolhas, três discos foliares de 9mm de diâmetro do primeiro trifólio de uma planta por

vaso, de cada cultivar, tratados com ulvana e suas respectivas testemunhas. Após sua coleta, os discos foliares foram imediatamente colocados com a superfície abaxial voltada para cima, em placas de Petri (5 cm) contendo papel de filtro previamente umedecido com solução de etanol e ácido acético (3:1 v/v) para a retirada da clorofila dos tecidos. A solução foi trocada periodicamente durante 3 dias. Em seguida, os discos foram lavados cuidadosamente na placa de Petri com água destilada e finalmente fixados em solução de lactoglicerol, ácido láctico e água destilada (1:1:1 v/v) (STADNIK & BUCHENAUER, 2000) e examinados com o auxílio de um microscópio óptico, sob aumento de 480X (PZO, modelo StudarLab, Polônia).

Os discos foliares foram montados em glicerina sobre lâminas de vidro. As estruturas do fungo sobre as folhas foram coradas com solução azul de Comassie em água destilada (0,1 mg / mL) no momento da contagem. A porcentagem de germinação e a formação de apressórios sobre os estômatos foram determinadas em cerca de 40 uredósporos por repetição. Os uredósporos e as estruturas de infecção foram fotografados com câmera digital (5.1 megapixels, modelo cyber-shot DSC-P93, marca Sony).

6.1.4 Determinação da atividade de peroxidases

Para as análises da atividade da enzima peroxidase, coletou-se o primeiro trifólio de quatro plantas tratadas com ulvana e das testemunhas, 48 horas após a inoculação. Durante a coleta, as amostras foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas sob gelo e, em seguida, armazenadas a -20°C até o momento das análises. O folíolo

lateral esquerdo de cada trifólio (Figura 3) foi macerado usando-se cadinho e pistilo de porcelana (100mL, Nalgon, Brasil) na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) contendo fluoreto de fenilmetanosulfonila (1mM) (Sigma, EUA). A suspensão foi transferida para microtubos de 2 mL (Axygen, EUA), centrifugada a 20.000 g/30 min, a 4° C, e o sobrenadante foi recolhido (extrato protéico).

A determinação da atividade de peroxidases foi medida espectrofotometricamente conforme STADNIK & BUCHENAUER (2000). Para tal, 20µL do extrato protéico foram adicionados em 2,9 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), contendo guaiacol 0,25% (v/v) (Sigma,EUA) e peróxido de hidrogênio 0,1 M (Merck, Alemanha). Os valores de absorbância da reação foram registrados a cada 30 segundos durante 4 minutos por meio de espectrofotômetro (modelo UV-1203, Shimatzo, Japão).

Determinou-se o teor de proteínas totais em cada amostra através do método de BRADFORD (1976). A curva padrão de proteínas (Anexo 15) foi determinada utilizando-se como proteína padrão a albumina de soro bovino (ASB, Sigma, USA). As atividades foram expressas em unidades de Densidade Óptica a 470 nm / mg proteína / min.

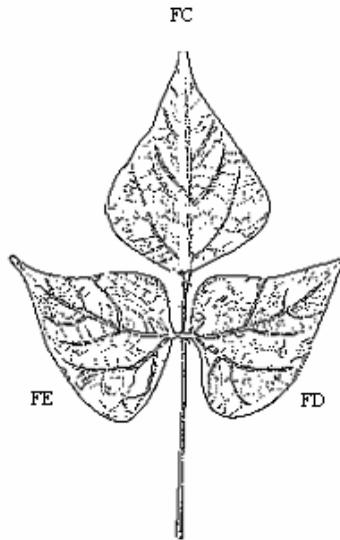


Figura 3. Diagrama ilustrativo de uma folha trifoliolada de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) na posição adaxial, onde foram determinadas as atividades de peroxidases (FE: folíolo esquerdo) e as atividades de glucanases (FD: folíolo direito). O folíolo central (FC) foi utilizado para as análises microscópicas.

6.1.5 Determinação das atividades de glucanases

Para determinar a atividade de glucanases, adotou-se o mesmo procedimento de coleta descrito no item 6.1.4. O primeiro trifólio de quatro plantas tratadas com ulvana e das testemunhas foram retirados 48 horas depois da inoculação e acondicionados de modo semelhante ao item 6.1.4. O folíolo lateral direito (Figura 3) foi macerado na presença de nitrogênio líquido, em seguida foram adicionados ao pó 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0). Para a determinação da

atividade de glucanases, uma alíquota de 20 μL do extrato protéico foi transferida para tubos de ensaio contendo 480 μL de laminarina (Sigma) na concentração de 1 mg / mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0). A reação foi realizada a 44 °C durante 60 min. Em seguida, os açúcares formados foram quantificados pelo método de LEVER (1972), adicionando-se à reação 1,5 mL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% em NaOH. A solução foi mantida por 5 min sob temperatura de 100 ° C em banho-maria. Após o resfriamento a temperatura ambiente, o produto foi quantificado em espectrofotômetro (700 Plus, FEMTO, Brasil), na absorvância de 410 nm (DI PIERO & PASCHOLATI, 2004) e convertido em mg de glicose, utilizando-se a curva padrão apresentada no Anexo 20. Para cada amostra, descontou-se a absorvância obtida a partir da mistura cujos reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 20 μL do respectivo extrato protéico + 1,5 mL da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 1% em NaOH (inativação enzimática) + 480 μL de laminarina (1mg / mL), de modo que o resultado final expressasse apenas açúcares provenientes da ação das glucanases.

Após a determinação da concentração de proteínas de cada amostra pelo método de BRADFORD (1976), a atividade das glucanases foi expressa em $\mu\text{Katal}/\text{mg}$ de proteína, sendo que 1 Katal é definido como a atividade enzimática que cataliza a formação de 1 mol de equivalente-glicose / segundo.

6.1.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi realizado utilizando-se o delineamento completamente casualizado. Para a avaliação do número e tamanho de pústulas foram utilizadas duas plantas de um vaso com três plantas como repetição, a planta restante foi utilizada para a retirada de amostras para as observações microscópicas (3 discos foliares do folíolo central) ou atividades de peroxidases e glucanases. Ao todo foram utilizadas 8 repetições para as análises do número e diâmetro das pústulas. As análises microscópicas e enzimáticas foram utilizadas 4 repetições. Depois de verificada a homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com esquema fatorial (3x2). O teste de separação de médias Tukey 5% foi empregado nas análises do NP/cm², diâmetros de pústulas e atividades enzimáticas. A porcentagem de germinação dos uredósporos e formação de apressórios foi analisada pelo teste de separação de médias LSD à 5% de probabilidade.

6.2. RESULTADOS

6.2.1 Número de pústulas

O número de pústulas de ferrugem nas diferentes cultivares do grupo carioca pulverizadas com ulvana ou água destilada variou de 0,342 a 1,490 pústulas/cm² (Tabela 7) A pulverização de ulvana não afetou significativamente esta variável (Anexo 12). Com relação às cultivares, foram encontradas diferenças entre a cv. BR IPA-11 Brígida (resistente), que apresentou a menor média, aproximadamente três vezes menor que a cv. IPR Juriti, onde foi verificado o maior número de pústulas/cm² (Tabela 7; Anexo 8).

Tabela 7. Número de pústulas /cm² no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados com de ulvana (10 mg/mL), 15

Cultivares	Número de pústulas /cm ²		
	Testemunha	Ulvana	Média *
BR IPA-11 Brígida	0,365	0,342	0,354 a
Pérola	0,908	0,943	0,926 b
IPR Juriti	1,490	1,120	1,309 b
Média	0,921	0,801 ^{ns}	

dias após a inoculação de *U. appendiculatus*

ns = Não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$).

* = Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de separação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade

6.2.2 Diâmetro das pústulas

As médias dos diâmetros de pústula nas diferentes cultivares de feijoeiro do grupo carioca, pulverizadas ou não com ulvana, estão apresentados resumidamente na Tabela 8. Os valores variaram de 316,8 a 616 μm . Houve diferença significativa entre as cultivares do grupo carioca (Anexo 9), sendo que no cv. BR IPA – 11 Brígida, as pústulas apresentaram menor diâmetro (381,2 μm). O tratamento com ulvana também teve efeito significativo, porém a interação entre cultivares x tratamento não foi significativa a 5% de probabilidade (Anexo 10). O diâmetro das pústulas foi menor nas cultivares tratadas com ulvana, sendo que na cv. IPR Juriti (suscetível) houve redução de praticamente 20% em relação aos diâmetros das pústulas de plantas da mesma cultivar pulverizadas com água destilada.

Tabela 8. Diâmetro médio das pústulas no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Cultivares	Diâmetro das pústulas (μm)		
	Testemunha	Ulvana	Média ^a
BR IPA –11 Brígida	445,5	316,8	381,2 a
Pérola	523,0	398,5	460,8 b
IPR Juriti	616,3	490,8	553,6 b
Média	528,3	402,1*	

^a Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste de separação de médias Tukey ao nível de 5% de probabilidade

* indica diferença significativa pelo teste F ($p \leq 0,05$).

6.2.3 Análises microscópicas

A pulverização de ulvana não alterou a germinação de uredósporos e a formação de apressórios sobre estômatos no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro 48 horas após a inoculação (Figura 4). A porcentagem de germinação dos uredósporos de *U. appendiculatus* foi significativamente maior na cv. BR IPA – 11 Brígida, onde foram observados cerca de 80% de uredósporos germinados (Tabela 9 e Anexo 11). Não foi observada correspondência entre as cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados ou não com ulvana (10 mg / mL) no desenvolvimento de apressórios sobre os estômatos na primeira folha trifoliada (Anexo 12).

Tabela 9. Porcentagem da germinação de uredósporos e formação de apressórios de *U. appendiculatus* sobre a superfície foliar de cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados ou não com ulvana.

Cultivares	Germinação de uredósporos %			Formação de apressórios %		
	Testemunha	Ulvana	Média*	Testemunha	Ulvana	Média ^{ns}
BR IPA-11 Brígida	76,7	81,6	79,2 a	39,7	34,0	36,8
Pérola	65,2	43,7	54,4 b	21,8	24,3	23,0
IPR Juriti	54,6	62,6	58,7 b	33,0	24,0	28,4
Média	65,5	62,7 ^{ns}		31,5	27,4 ^{ns}	

* Médias seguidas por letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste LSD 5%.

^{ns} = não significativo

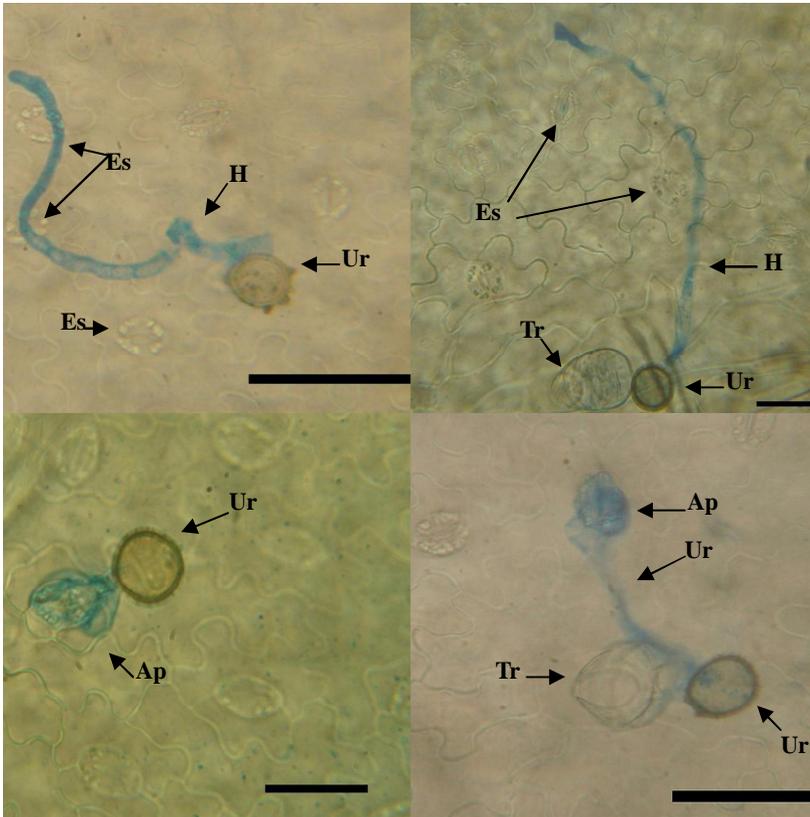


Figura 4. Germinação de uredósporos de *U. appendiculatus* sobre a superfície abaxial dos trifólios de feijoeiro observados 48 horas após a inoculação. Ap = apressório; Es = estômato; H = hifa; Tr = tricoma; Ur = uredósporo germinado. Barras = 50 μ m.

6.2.4 Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases nos folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizadas com solução de ulvana (10 mg / mL) ou água destilada 48 horas após a inoculação de *U. Appendiculatus* variou de 34,7 a 55,4 unidades de densidade óptica / mg

de proteína / min (Tabela 10). A maior atividade foi observada na cv. IPR Juriti (suscetível), enquanto que a menor atividade foi verificada na cv. BR IPA – 11 Brígida (Anexo 14). A atividade de peroxidases foi analisada utilizando-se a análise de variância no esquema bifatorial (3 cultivares e 2 tratamentos) o desdobramento da interação dupla pode ser observado na Tabela 10. A pulverização de ulvana não afetou significativamente a atividade de peroxidases, quando comparada com as amostras pulverizadas com água destilada (Anexo 14).

Tabela 10. Atividade de peroxidases 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizados ou não com o ulvana (10 mg/mL).

Cultivares	Densidade óptica/mg proteína/min		
	Testemunha	Ulvana	Média *
BR IPA-11 Brígida	36,3	36,3	36,3 a
Pérola	34,7	47,6	41,3 ab
IPR Juriti	54,7	55,4	55,0 b
Média	42,0	47,3 ^{ns}	

ns = Não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$).

* = Médias diferentes indicam diferença significativa pelo teste de separação de média Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

6.2.5 Atividade de β – 1,3 Glucanases

A atividade de glucanases 48 horas após a inoculação nos folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca pulverizadas com ulvana (10 mg / mL) ou água destilada foi analisada

através de esquema bifatorial (3 cultivares e 2 tratamentos). Pela análise de variância, foi possível observar que houve interação entre as cultivares do grupo carioca com diferentes níveis de resistência à ferrugem e a pulverização de ulvana (Anexo 17 e 18). A atividade de glucanases foi 190 % maior nas plantas do cv. Pérola (moderadamente suscetível) pulverizadas com ulvana em relação às respectivas plantas pulverizadas com água destilada (Figura 5). Nas outras duas cultivares, não houve efeito significativo da ulvana sobre a atividade enzimática. A maior atividade de glucanases foi observada em plantas da cv. Juriti (suscetível).

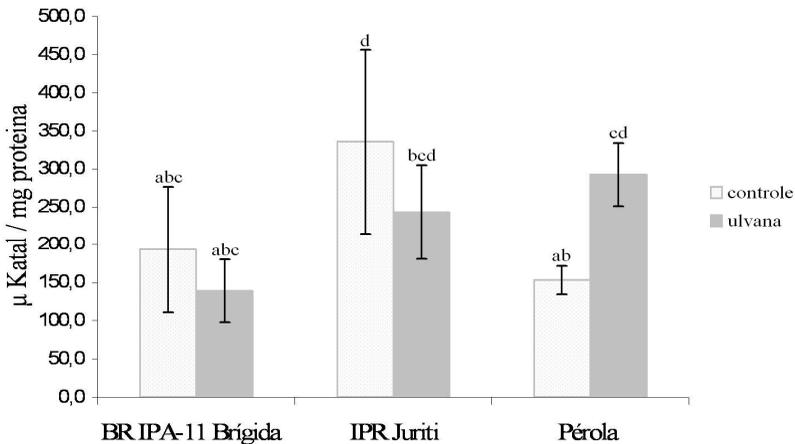


Figura 5. Atividade de glucanases 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, Pérola e IPR Juriti pulverizados com ulvana ou água destilada.

6.3 DISCUSSÃO

A atividade elicitora de resistência em plantas contra patógenos tem sido relatada com a utilização de diversos polissacarídeos obtidos de macroalgas marinhas. MERCIER *et al.* (2001) observaram a expressão de genes de defesa em folhas de fumo a partir de 24 horas após a aplicação de carragenas extraídas das algas vermelhas *G. acicularis* e *G. pistilla*. Os efeitos foram semelhantes aos da aplicação de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* como elicitor de defesa. Os polissacarídeos laminaranas e laminarinas, extraídas da alga marrom *Laminaria digitata*, são componentes de alguns fertilizantes comerciais a base de algas e também são conhecidos por seu efeito como elicitor de respostas de defesa em fumo contra *Erwinia carotovora* (KLARZYNSKI *et al.*, 2000) e em videira contra *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea* (AZZIZ *et al.*, 2003). A ulvana é relatada como ativadora de defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos e elicitora dos mecanismos de absorção do nitrogênio e síntese protéica (BRIAND *et al.*, 2005a; BRIAND *et al.*, 2005b).

No presente trabalho, a pulverização do polissacarídeo ulvana promoveu redução do diâmetro das pústulas de *U. appendiculatus* em plantas de feijão das cultivares Brígida, Pérola e Juriti pulverizadas aos 6 e 3 dias antes da inoculação do patógeno, quando comparado com as plantas da mesma cultivar tratadas com água destilada, não tendo sido observadas diferenças significativas no número de pústulas/cm² (Figura 4). Este resultado é semelhante ao obtido por FERNANDES (2007), o qual observou a redução do crescimento das lesões de antracnose do feijoeiro causada pelo fungo hemibiotrófico *C. lindemuthianum* em

plantas da cv. suscetível à antracnose (IPR Uirapuru) tratadas preventivamente com ulvana. Menores pústulas produzem menos uredósporos, reduzindo o inóculo (STATLER & MCVEY, 1987), contribuindo para diminuir o progresso da doença. Este comportamento sugere a ativação de algum mecanismo de defesa devido ao tratamento com o polissacarídeo.

O processo de infecção das ferrugens, de um modo geral, pode ser dividido em etapas: deposição dos uredósporos, germinação, formação do apressório sobre estômatos, penetração na cavidade subestomática, desenvolvimento da célula-mãe do haustório e a formação do primeiro haustório. Depois ocorrem à colonização da planta, produção e liberação dos uredósporos. Alguns mecanismos de prevenção contra as ferrugens podem ocorrer antes da penetração via estômato por *Uromyces* spp., como a fraca adesão dos uredóporos sobre a superfície da folha (DEISING *et al.*, 1992). WYNN, (1976) demonstrou que o estímulo para germinação e a formação de apressórios de *U. appendiculatus* é independente do hospedeiro, podendo ser realizada em réplicas da superfície das folhas feitas de plástico.

No atual estudo, verificou-se que a maior porcentagem de germinação de uredósporos sobre a superfície foliar foi encontrada na cv. BR IPA-11 Brígida (resistente). A pulverização de ulvana não teve efeito diferencial sobre a germinação de *U. appendiculatus*, diferentemente do observado por FERNANDES (2007) em folíolos de feijoeiro cvs. Uirapuru e Mouro Graúdo tratados com ulvana e inoculados com o fungo *C. lindemuthianum*. A porcentagem de apressórios formados sobre estômatos, embora não significativa, também foi maior nessa cultivar (Tabela 10), sugerindo que o

mecanismo de resistência da cv. BR IPA-11 Brígida atue nas fases posteriores à infecção.

Observações semelhantes foram feitas em outras leguminosas com resistência parcial à ferrugem, onde o menor nível de doença esteve associado à menor formação e desenvolvimento de haustórios pelos agentes causais, prejudicando a colonização da planta, uma etapa pós-infecção. SILLERO & RUBIALES (2002) observaram que o tamanho e o número de haustórios foram reduzidos em duas linhagens de feijão-fava com resistência parcial à *Uromyces fabae* (Pers.) de Bary, quando comparadas com a linhagem suscetível. A resistência de genótipos de *Medicago truncatula* à ferrugem da alfafa (*Uromyces striatus* Schroet.) ocorreu pela restrição da formação do haustório e redução do número de haustórios, ocasionando a diminuição do crescimento da colônia (RUBIALES & MORAL, 2004). O haustório é um órgão especializado para a obtenção de nutrientes do hospedeiro, sendo a penetração na célula da planta e a invaginação do plasmalema da célula hospedeira fases críticas no desenvolvimento de fungos biotróficos (HEATH, 1997; NICKS & RUBIALES, 2002).

As respostas de plantas a patógenos dependem de vários fatores, muitos destes são alterações metabólicas provocadas por perturbações causadas por patógenos específicos. As atividades de duas enzimas relacionadas com a defesa neste trabalho foram detectadas em todas as cultivares, independente do nível de resistência. As peroxidases estão envolvidas em várias etapas do processo fisiológico vegetal, incluindo a resistência da planta a fitopatógenos. A atividade desta enzima pode produzir radicais livres tóxicos para o patógeno e participar do reforço da parede celular da planta através do envolvimento nas etapas finais da

biossíntese de lignina (STADNIK & BUCHENAUER, 2000). As peroxidases estão geralmente relacionadas com respostas de resistência locais e sistêmicas em várias espécies vegetais (PASSARDI *et al.*, 2005). No presente trabalho, observou-se que a atividade de peroxidases 48 horas após a inoculação foi maior na cv. IPR Juriti, caracterizada como suscetível, com um aumento de pelo menos 65% em relação à atividade na cv. resistente BR IPA – 11 Juriti, independente do tratamento com ulvana. ROLDÁN SERRANO *et al.*, (2007) verificaram que as atividades de peroxidases e quitinases em hipocótilos de plântulas de girassol também foram significativamente maiores nas plântulas suscetíveis ao míldio (*Plasmopara halstedii* Berl. & de Tomy) do que nas resistentes.

A β -1,3-glucanase é uma enzima hidrolítica que apresenta ação direta contra o patógeno, degradando sua parede celular e possivelmente atuando como uma barreira química, inibindo a formação do haustório na célula hospedeira (HU & RIJKENBERG, 1998). A figura 4 mostra que, a exemplo do ocorrido para as peroxidases, plantas da cv. Resistente BR IPA – 11 Brígida apresentaram menor atividade desta enzima que a cv. suscetível IPR Juriti. A pulverização de ulvana causou o aumento da atividade de glucanases somente nas plantas da cv. Pérola (moderadamente suscetível), mas não em Juriti, um cultivar com maior nível de suscetibilidade. Desse modo, a participação dessa enzima na redução do número de pústulas da ferrugem é questionável. Uma explicação para este resultado contraditório é que não são todas as glucanases que possuem atividade antifúngica (SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993). RAUSCHER *et al.*, (1999) observaram aumento na expressão de β – 1,3-glucanases e quitinases em plantas de feijão-fava (*Vicia faba*

L.) tratadas e não tratadas com os indutores ácido salicílico e ácido 2,6-dicloro isonicotínico, no entanto, a presença dessas enzimas não afetou o desenvolvimento de *U. fabae*. Os mesmos autores verificaram a ação anti-fúngica relacionada às proteínas de defesa da família PR-1, resultando na redução da diferenciação celular depois da formação do apressório, sugerindo que o mecanismo de resistência afeta as fases posteriores de desenvolvimento do fungo.

Em algumas situações, o aumento na atividade enzimática pode ser mais uma conseqüência no metabolismo da planta após a infecção do que propriamente uma resposta conduzindo à defesa (ROLDAN SERRANO *et al.*, (2007). Para a maioria dos fungos causadores de ferrugens, o primeiro haustório é formado entre 24 e 48 horas após a inoculação das plantas (EMERAN *et al.*, 2005), enquanto que as análises de peroxidases e glucanases do atual trabalho foram efetuadas 48 horas depois. Pode ser que o genótipo suscetível, não bloqueando a colonização fúngica logo nas fases iniciais através de mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência, passou a produzir uma grande quantidade de enzimas de defesa num momento inoportuno, quando a atividade dessas já não poderia mais atuar eficientemente sobre o fungo. Ao contrário, o genótipo resistente, restringindo a colonização fúngica logo nas primeiras etapas, cessou a elicitação de repostas de resistência, culminando com uma menor biossíntese de glucanases e peroxidases nas fases posteriores.

Por outro lado, SIEGRIST *et al.* (1997) verificaram associação da redução da severidade da ferrugem e a alta produção de glucanases em fluídos intercelulares de folhas de feijoeiro tratados com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculados com *U. appendiculatus* quando

comparadas com as plantas não tratadas. IRITI & FAORO (2003), trabalhando com o mesmo patossistema através de análises histológicas, observaram o acúmulo de peróxido de hidrogênio nos tecidos das folhas entre 12 e 48 horas após o tratamento com ASM, mas sem a ocorrência de reação de hipersensibilidade, evidenciando a alta atividade de peroxidase nas plantas que expressaram resistências, atuando principalmente no reforço da parede celular pela ligação de proteínas e deposição de lignina.

No presente trabalho, não foi possível atribuir isoladamente a um dos mecanismos de defesa estudados um papel de grande significância na resistência de feijoeiro à ferrugem ou na forma de atuação do polissacarídeo ulvana. Segundo TUZUN (2001), as respostas de defesa em plantas envolvem a ativação múltipla e coordenada de diversos genes de resistência e a somatória das contribuições individuais de cada gene poderia explicar melhor a resistência quantitativa de uma cultivar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. (Ed.) **Plant Pathology**, Academic Press, San Diego 635 p., 2005.

ANDERSON, J. A.; SMITH, B. M.; WASHNOCK C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 70 (suppl.), p. 464S–474S, 1999.

ALEXANDER, H. M.; GROTH, J. V.; ROELFS, A. P. Virulence changes in *Uromyces appendiculatus* after asexual generations on a partially resistant cultivar of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathology**, v. 75, p. 449-453, 1985.

ALZATE-MARIN, A. L.; SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN V. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS E. G. Allelism tests between the rust resistance gene present in common bean cultivar Ouro Negro and genes Ur-5 and Ur-11. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 60-64, 2004.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J.; BORSATO, L. C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n.2, p. 148-152, 2008.

AZIZ, A.; POINSSOT, B.; DAIRE, X.; ADRIAN, M.; BÉZIER, A.; B. LAMBERT, B.; JOUBERT, J.M.; ALAIN PUGIN, A. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protein against *Botrytis*

cinerea and *Plasmopara viticola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 12, p. 1118 – 1128, 2003.

BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; HAU, B. Effects of bean line pattern mosaic virus on the monocyclic components of rust and angular leaf spot of *Phaseolus* bean at different temperatures, **Plant Pathology**, v. 47, 289-298, 1998.

BASSETT, M. J. (org.) List of genes - *Phaseolus vulgaris*. Disponível em: <<http://www.css.msu.edu/bic/PDF/BeanGenesList.pdf> >. Acesso em: agosto 2006.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L. REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.) **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, v. 2, p. 112-128, 4ª ed., Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 2005.

BÖKER-TÔRRES, M. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Composição florística do acrofitobentos da Lagoa da Conceição (Florianópolis – SC), p. 74, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n.1/2, p. 248-254, 1976.

BRIAND, X.; CLUZET, S.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T.; SALAMAGNE, S. DUMAS, B. European Patent WO 2005094581, PI 0509523-9A, 2005a.

BRIAND, X.; CLUZET, S.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T.; SALAMAGNE, S.; DUMAS, B. European Patent WO 2005094588, PI 0509578-6A, 2005b.

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

CAMARGO, L. E. A. Análise genética resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**, p. 471, Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 1995.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, L.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; DUMAS, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 917-928, 2004.

CUTT, J. R.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid in plants. A changing perspective. **Pharmaceutical Technology**, 16, p. 25-34, 1992.

DEISING, H.; NICHOLSON, R. L.; HAUG, M.; HOWARD, R. J.; MENDGEN, K. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. **The Plant Cell**, V. 4, p. 1101-1111, 1992.

DI PIERO, R. M.; GARCIA JR, D.; TONUCCI, N. M. Indutores bióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, A.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L.V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**, p. 29-50, FEALQ, Piracicaba – SP, 2005.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 57-62, 2004.

DI PIERO, R. M.; WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, 175-180. 2006

ELIAS, H. T.; HEMP, S. ; FLESCHE, R. D. ; NICKNICH, W.; ALEXANDRE, A. D. SCS 202 - Guará: Nova cultivar de feijoeiro para Santa Catarina. **4ª Reunião Técnica Catarinense de Milho e Feijão**. Resumos Expandidos, p. 320-322, Lages-SC: CAV-UDESC, 2003.

ELIAS, H. T.; SILMAR HEMP, S.; SCAPIM, C. A.; RODOVALHO, M. A.; ROYER, M. R.; MORA, F.; BARRETO R. F. Análise da estabilidade de genótipos de feijoeiro no Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 4, p. 623-628, 2005.

EMERAN, A. A.; SILLERO, J. C.; NIKS, R. E.; RUBIALES, D. Infection structures of host-specialized isolates of *Uromyces viciaefabae* and of other species of *Uromyces* infecting leguminous crops. **Plant Disease**, v. 89 p.17-22, 2005

EPAGRI, **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2007 – 2008** p. 80 – 102, Florianópolis/SC, 2008.

FALEIRO, F. G.; VINHADELLI, W. S.; RAGAGNIN, V. A.; ZAMBOLIM, L.; PAULA JR T. J.; MOREIRA, M .A.; E.G. BARROS, E. G. Identificação de raças fisiológicas de *Uromyces appendiculatus* no estado de Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 166–169, 1999.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; VINHADELLI, W. S.; MOREIRA, M. A.; STAVELY J. R.; BARROS, E. G. Resistência de linhagens de feijoeiro a quatro raças de *Uromyces appendiculatus* isoladas em Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia brasileira**, v. 26, n. 1, p.77 - 80, 2001.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Ecofisiologia e fenologia do feijoeiro: Tecnologia da produção de Feijão irrigado**. Piracicaba: ESALQ/USP, Departamento de Agricultura, 1997. 182 p.

FERNANDES, W. S. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Respostas de defesa e resistência induzida por ulvana à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 85, 2007.

GARCÍA, M. R.; IGLESIAS, O. V.; CONCEPCIÓN, A .R.; GONZÁLEZ I. H.; PÉREZ J. R. Extracto del alga *Ulva fasciata* evaluado para uso cosmetológico. In. **IV Congreso Nacional de Farmacología y Terapéutica**, Anais. P. 109-111, Cuba, 2002.

GESTINARI, L. M. S.; HENRIQUES, A. B.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Utilização da farinha seca de *Ulva* spp. e *Sargassum* spp. como bioestimulantes de crescimento na olericultuta. **Leandra**, n. 17 p. 45-70, 2002.

HABTU, A.; ZADOKS, J. C. Components of partial resistance in *Phaseolus* beans against an Ethiopian isolate of bean rust. **Euphytica**, v.83, n.2, p.95-102, 1995.

HEATH, M. C. Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to the cowpea rust fungus. **New Phytologist**. v. 138, p. 251–263, 1998.

HU, G. RIJKENBERG, F. H. J. Subcellular localization of b-1,3-glucanase in *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* infected wheat leaves. **Planta**, v. 204, p. 324-334, 1998

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

ITIS, Integrated Taxonomic Information System. Disponível em: < www.itis.usda.gov >. Acesso em: julho de 2008.

IMHOFF, M. W.; MAIN, C. E.; LEONARD, K. J. Effect of temperature, dew period and age of leaves, spores, and source pustules on germination of bean rust. **Phytopathology**, v. 71, p. 577-583, 1981.

JESUS JUNIOR, W. C.; VALE, F. X. R.; MARTINEZ, C. A.; COELHO, R. R.; COSTA, L. C.; HAU, B.; ZAMBOLIM, L. Effects of angular leaf spot and rust on leaf gas exchange and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Photosynthetica**, v. 39, p. 603–606, 2001.

JONGEDIJK, E.; TIGELAAR, H.; VAN ROEKEL, J. S. C. SANDRA A. BRES-VLOEMANS, S. A.; DEKKER, I.; VAN DEN ELZEN, P. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. C. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica**, v. 85, p. 173 -180, 1995.

KANG, Z.; HUANG, L.; BUCHENAUER, H. Subcellular localization of chitinase and β -1,3-glucanase in compatible and incompatible interactions between wheat and *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 110 n. 2, p. 170–183, 2003.

KIRALY, L.; BARNA, B.; KIRALY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathology** , v. 155, p. 385–396, 2007.

KLARZYNSKI, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J. M.; YVIN, J. C.; KOPP, M.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1027-1037, 2000.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

LEHNINGER, A. NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.) **Principles of Biochemistry**. 4th Ed. Freeman press, p. 1121, 2004.

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

LIEBENBERG, M. M.; LIEBENBERG, A. J.; PRETORIUS, Z. A. Improvement of the rust resistance of dry beans in South Africa. **Annual Report of the bean improvement cooperative**, v. 48, p.185 -187, 2003.

MARKOVICH, N. A. KONONOVA, G. L. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 341–351, 2003.

MARTINS, D. A. **Trabalho de Conclusão de Curso de Agronomia.** Universidade Federal de Santa Catarina. Uso de extratos à base de algas para controlar a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) do feijoeiro., p. 49, 2004.

MCMILLAN, M. S., SCHWARTZ, H. F., OTTO, K. L. Sexual stage development of *Uromyces appendiculatus* and its potential use for disease resistance screening of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Disease**, v. 87, p.:1133-1138, 2003.

MERCIER, L.; LAFITTE, C.; BORDERIES, G.; BRIAND, X.; ESQUERRE-TUGAYE, M.; FOURNIER, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. **New Phytologist**, v. 149, p. 43 – 51, 2001.

MIKLAS, P. N.; KELLY, J. D.; BEEBE, S. E.; MATTHEW W.; BLAIR, M. W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, p. 105–131, 2006.

MMBAGA, M.T.; STEADMAN J.R. Adult plant rust resistance in common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Plant Disease**, v. 76, p. 1128-1135, 1992

MMBAGA, M.T.; STEADMAN, J. R.; ; ESKRIDGE, K.M. Virulence patterns of *Uromyces appendiculatus* from different geographic areas and implications for finding durable resistance to rust of common bean. **Journal of Phytopathology**. v. 144, p. 533-541, 1996.

MODA-CIRINO, V.; OLIARI, L.; FONSECA JÚNIOR, N. S.; LOLLATO, M. A. IPR Juriti – common bean cultivar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 303-306, 2003.

NETO, D. D.; ITO, M. A. Panorama atual da cultura de Feijão. In: CASTRO, L.; ITO, M.F. (Coord.) **Dia de Campo de Feijão, anais (Documentos IAC; n. 76)** Instituto agrônômico, p. 6, Campinas-SP, 2006.

NISHIMURA, M.; SOMERVILLE, S. Resisting attack. **Science**, v. 295, p. 2032-2033, 2002.

OCHOA, J.; CRUZ, E.; MURILLO, A.; DANIAL, D. L. Variation in virulence and resistance in the bean-bean rust pathosystem in Ecuador. **Euphytica**, v. 153, p. 313-319, 2002.

OHM, J. W.; SHANER, G. E. Three components of slow leaf-rusting at different growth stages in wheat. **Phytopathology**, v. 66, p.1356-1360, 1976.

OLIVEIRA FILHO, E. C. A. Exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. **Phycological Society of Latin-America**, v. 1, p. 5-18, 1981.

OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMANCIO, C. E.; SANT' ANNA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: Diversidade, exploração e conservação. In. **Agência Nacional do**

Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (Organizadores):. Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <
<http://www.anp.gov.br/ibamaperfurac/refer/plantasmarinhas.pdf>>.

Acesso em : maio 2005.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZOFERRATO, L.; LIQUORI, A. M. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **International Journal of Biology Macromolecules**, v. 25, p. 309–315, 1999.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 17, p. 203-222, 1979.

PASSARDI, F. COSIO, C.; PENEL, C. DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 255-265, 2005.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**, v. 1, p. 417-454, Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 1995.

PAULERT, R. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata*., p. 90, 2005.

PAULERT, R.; SMANIA JUNIOR, A.; STADNIK, M. J.; PIZZOLATTI, M. G. Antimicrobial properties of extracts from the green seaweed *Ulva fasciata* Delile against pathogenic bacteria and fungi. **Algological Studies**, v. , p. 123 – 130, 2007.

PENGZHAN, Y.; NING, L. XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**, v. 48, p. 543–549, 2003.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEN, C. Sugar determination in ulvans by a chemical–enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 179–88, 1997.

QUIROGA, M.; GUERERO, C.; BOTELLA, M. A.; BARCELO, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M. I.; ALONSO, F. J.; DE FORCHETTI, S.M.; TIGER, H.; VALPUESTA, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1119-1127, 2000.

RAGAGNIN, V. A.; ALZATE-MARIN, A. L.; SOUZA, T. L. P. O.; ARRUDA, K. M. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro ao *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 591-596, 2003.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 4, p. 494-503, 2004.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L., CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28 n. 2, p. 123-129, 2003.

RIOS, G. P. Ferrugem. In. SARTORATO, A. RAVA, C. A. (Ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 68-84, 1994.

RIOS, G. P.; ANDRADE, E. M.; COSTA, J. L. S. Avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro comum a diferentes populações de *Uromyces appendiculatus*. **Fitopatologia brasileira**, v. 26, n. 2, p. 128-133, 2001.

RODRIGUES, L. S.; ANTUNES, I. F.; TEIXEIRA, M. G.; SILVA, J.B. Divergência genética entre cultivares locais e cultivares melhoradas de feijão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p.1275-1284, 2002.

ROLDÁN SERRANO, A.; LUNA DEL CASTILLO, J.; JORRÍN NOVO, J.; A. FERNÁNDEZ OCAÑA, A.; GÓMEZ RODRÍGUEZ, M. V. Chitinase and peroxidase activities in sunflower hypocotyls: effects of BTH and inoculation with *Plasmopara halstedii*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 149-152, 2007

RUBIALES, D.; MORAL, A. Prehaustorial resistance against alfalfa rust (*Uromyces striatus*) in *Medicago truncatula*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 239–243, 2004.

SEEVERS, P. M.; DALY, J. M.; CATEDRAL, F. F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. **Plant Physiology**, v. 48, n. 353-360, 1971.

SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; ELZEN, P. van den; CORNELISSEN, B. Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3 glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology**, v. 101, p. 857-863, 1993.

SIEGRIST, J.; GLENEWINKEL, D.; KOLLE, C.; SCHIMIDTKE, M. Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 104 n. 599-610, 1997.

SILLERO, J. C.; MORENO, M. T.; RUBIALES, D.. Identification and characterization of new sources of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in a germplasm collection of *Vicia faba*. **Plant Pathology**, v. 49, P. 389-395, 2000.

SILLERO, J. C.; FONDEVILLA, S.; DAVIDSON, J.; VAZ PATTO, M. C.; WARKENTIN, T. D.; THOMAS, J.; RUBIALES, D. Screening techniques and sources of resistance to rusts and mildews in grain legumes. **Euphytica**, v. 147: 255–272, 2006.

SILVA, S. R.; RIOS, G. P.; SILVANDO, C. S. Influência da resistência e do período de molhamento na infecção e desenvolvimento de lesões de ferrugem no feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 726-731, 2001.

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. **Crop Science**, v. 41, p 1659-1675, 2001.

SOUZA, T. L. P. O.; RAGAGNIN, V. A.; SANGLARG, D. A.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Classification of *Uromyces appendiculatus* physiological races from Minas Gerais, Brazil, using the new binary system. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 48, p.158 -161, 2003.

SOUZA, T. L. P. O.; ALZATE-MARIN, A. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Análise comparativa da variabilidade patogênica de *Uromyces appendiculatus* em algumas regiões brasileiras. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 143-149, 2005

STATLER, G. D.; MCVEY, M. A. Partial resistance to *Uromyces appendiculatus* in dry edible beans. **Phytopathology**, v. 77, p. 1101-1103, 1987.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25-34, 2000.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W.; SAITO, M. L. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 110, p. 383-393, 2003.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (eds.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, p. 221-244, 2004.

STADNIK, M. J.; PAULERT, R. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. **Museu Nacional do Rio de Janeiro**, v. 30, p. 267-279, Rio de Janeiro, 2008.

STEADMAN, J. R.; PASTOR-CORRALES, M. A.; BEAVER, J. S. An overview of the 3rd bean rust and 2nd bean common bacterial blight international workshops. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 45, p. 120-125, Pietermaritzburg, South Africa, 2002.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. R. A. Variabilidade genética do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. **EMBRAPA documento n° 126**, 2000.

STAVELY, J. R.; FREYTAG, G. F.; STEADMAN, J. R.; SCHWARTZ, H. F. The 1983 bean rust workshop. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 26, 1983.

STAVELY, J. R.; STEADMAN, J. R.; MCMILLAN, R. T.; New pathogenic variability in *Uromyces appendiculatus* in North America. **Plant Disease**, v. 73, p. 428-432, 1989.

TUZUN, S. The relation between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 85-93, 2001.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

WOSNITZA, T. M. A.; BARRANTES, J. G. Utilization of seaweed *Ulva* sp. in Paracas Bay (Peru): experimenting with compost. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 27–31, 2005.

XUE, L., CHAREST, P. M., and JABAJI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, v. 88, p. 359-365, 1998.

ZIMMERMANN, F. J. P. **Estatística aplicada à pesquisa agrícola**, 1^a edição. Embrapa Arroz e Feijão. 402 p., Santo Antônio de Goiás - GO, 2004.

ZUPPI, M.; MENTEN, J. O.; LIMA L. C. S. F.; RABALHO, A. A.; FRARE, V. C. Produtos fitossanitários utilizados no feijoeiro no Brasil: Evolução e situação atual. In: **VIII CONAFE - Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, palestras**, p. 1261- 1269, Goiânia – GO, 2005.

8. ANEXOS

Anexo 1. Valores do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm^2)^b e diâmetro das pústulas (DP) no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro, 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Genótipos	Experimento	Datas ^a	NP/cm ²	DMP (µm)
AL 9021332			0,107	184
CF 128 Abelardo Luz			0,68	302
BRS Valente			0,903	318
Pérola	1	29/05 – 26/06/07	1,43	352
FT 9901			1,431	342
FT Paulistinha			1,89	356
CHC 97-29			2,31	401
Becker bela vista			2,638	337
FT 991159			0	0
BR IPA -11 Brígida			0,018	184
Ivo Risolis Wittmarsum	2	05/06 – 03/07/07	0,03	198
Pérola			0,094	347
LP 97-04			0,665	323
MD 841			1,211	158
SEL. CP9310635			2,093	203
Pérola			2,247	350
FT Soberano			2,44	240
Rudá	3	26/06 – 23/07/07	2,886	224
CF 73 Piratuba			2,955	321
CF 69 Caibi			3,072	280
FT 84113			3,491	429
CI 96712V			3,828	226
CHC 90-1535			5,51	403
FT 84-113			0	0
CHC 9713			1,167	408
LH 11			1,195	368
Carioca			1,288	262
IPR Juriti	4	04/07 – 31/07/07	1,754	370
Pérola			1,754	393
CHP 97-04			1,879	340
LP 98-05			2,049	389
CF 49			3,253	471
Tahyu			4,197	384
FT 91-1249			1,181	208
Pérola			1,39	475
CF 68			1,498	363
CHC 9703			1,55	310
VI 4599	5	11/07 – 07/08/07	2,153	479
TB 9401			2,324	239
Sogro/Daniel			3,382	577
IPR Uirapuru			3,721	527
SCS 202 Guará			4,684	590

^a Datas da semeadura até a última avaliação, respectivamente.

Anexo 2. Análise de variância da porcentagem do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²)^a, no primeiro trifólio, em relação ao PMS das cultivares de feijoeiro 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

experimentos	Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
1	Cultivares	7	655,98	93,71	3,531	0,004
	Erro	40	1061,09	26,52		
	Total corrigido	47	1717,08			
2	Cultivares	3	1960,65	653,55	8,744	0,006
	Erro	20	1494,94	74,74		
	Total corrigido	23	3455,60			
3	Cultivares	9	310,35	34,48	4,057	0,004
	Erro	60	509,97	8,50		
	Total corrigido	69	820,32			
4	Cultivares	8	1101,38	137,67	5,958	0,001
	Erro	54	1224,60	23,10		
	Total corrigido	62	2325,98			
5	Cultivares	8	612,38	76,54	3,016	0,007
	Erro	54	1345,35	25,38		
	Total corrigido	62	1957,74			

^a Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$

Anexo 3. Análise de variância da porcentagem dos diâmetros das pústulas (DP), das cultivares de feijoeiro em relação ao cv. Pérola no primeiro trifólio, 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Experimentos	Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
1	Cultivares	7	16178,64	2311,23	4,842	0,005
	Erro	40	19092,57	477,31		
	Total corrigido	47	35271,21			
2	Cultivares	3	10017,96	3339,32	12,68	0,001
	Erro	20	5267,01	263,35		
	Total corrigido	23	15284,97			
3	Cultivares	9	43942,56	4882,50	10,58	0,001
	Erro	60	27669,76	461,16		
	Total corrigido	69	71612,32			
4	Cultivares	8	11244,70	1405,58	2,157	0,035
	Erro	54	35185,86	651,60		
	Total corrigido	62	46430,56			
5	Cultivares	8	51636,43	6454,55	28,88	0,001
	Erro	54	11843,86	223,47		
	Total corrigido	62	63480,29			

GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado.

Anexo 4. Análise de variância da porcentagem dos valores do índice de doença (ID)^a, das cultivares de feijoeiro em relação ao cv. Pérola no primeiro trifólio 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Experimentos	Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
1	Cultivares	7	16,60	2,37	3,823	0,003
	Erro	40	24,81	0,62		
	Total corrigido	47	41,41			
2	Cultivares	3	16,00	5,33	5,055	0,009
	Erro	20	21,10	1,05		
	Total corrigido	23	37,10			
3	Cultivares	9	3,24	0,36	5,575	0,001
	Erro	60	3,88	0,064		
	Total corrigido	69	7,12			
4	Cultivares	8	6,06	0,75	5,595	0,0001
	Erro	54	7,31	0,13		
	Total corrigido	62	13,37			
5	Cultivares	8	8,14	1,01	2,807	0,0112
	Erro	54	19,58	0,36		
	Total corrigido	62	27,72			

^a Dados transformados em $\log x + 1$

Anexo 5. Resultado do teste de agrupamento de médias de Scott Knott 5% para o número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²), no primeiro trifólio, em relação ao cv. Pérola, das cultivares de feijoeiro 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Genótipos	Experimentos	Médias	Resultado do teste*	CV%
AL 9021332	1	15,2	A	24,0
CF 28 Abelardo Luz		47,4	A	
Pérola (PMS)		100,0	B	
Becker Bela Vista		126,4	B	
BRS Valente		174,5	B	
CHC 97-29		188,0	B	
FT Paulistinha		261,3	C	
FT 9901		276,4	C	
Ivo Risolis Wittmarsum		2	21,0	
BR IPA-11 Brídida	28,7		A	
Pérola (PMS)	100,0		B	
LP 97-04	692,4		C	
MD 841	3	52,4	A	24,3
SEL. CP9310635		93,2	B	
Pérola (PMS)		100,0	B	
FT Soberano		108,7	B	
Rudá		128,5	B	
CF 73 Piratuba		131,5	B	
CF 69 Caibi		136,7	B	
FT 84113		155,3	B	
CI 96712V		170,3	B	
CHC 90-1535	245,1	C		
Pérola (PMS)	4	100,0	A	22,7
CHC 9713		197,0	A	
LH 11		201,7	A	
Carioca		217,7	A	
IPR Juriti		296,4	B	
LP 98-05		297,0	B	
CHP 97-04		318,0	B	
CF 49		550,0	C	
Tahyu		632,2	C	
FT 91-1249	5	85,0	A	18,8
Pérola (PMS)		100,0	A	
CF 68		107,6	A	
CHC 9703		111,5	A	
VI 4599		132,7	A	
TB 9401		167,0	A	
Sogro Daniel		243,2	B	
IPR Uirapuru		253,4	B	
SCS Guará		336,8	B	

CV = Coeficiente de variação.

* Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 6. Resultado do teste de agrupamento de médias Scott Knott 5% para porcentagem dos diâmetros das pústulas em relação ao PMS das cultivares de feijoeiro 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Genótipos	Experimentos	%DMP	Resultado do teste *	CV%
AL 9021332	1	52,4	A	23,3
CF 128 Abelardo Luz		88,6	B	
BRS Valente		90,6	B	
Becker Bela Vista		96,0	B	
FT 9901		97,3	B	
FT Paulistinha		101,4	B	
Pérola (PMS)		100,0	B	
CHC 97-29		114,1	B	
BR IPA-11 Brígida		2	53,0	
Ivo Risolis Wittmarsum	57,0		A	
LP 97-04	93,2		B	
Pérola (PMS)	100,0		B	
MD 841	3	45,2	A	26,3
SEL. CP9310635		58,0	A	
Rudá		64,2	A	
CI 96712V		64,8	A	
FT Soberano		70,0	A	
CF 69 Caibi		80,3	B	
CF 73 Piratuba		92,0	B	
Pérola (PMS)		100,0	B	
CHC 90-1535		115,6	B	
FT 84113		127,0	B	
Carioca		4	66,6	
CHP 97-04	86,3		B	
LH 11	93,4		B	
IPR Juriti	94,0		B	
Tahyu	97,5		B	
LP 98-05	98,8		B	
Pérola (PMS)	100,0		B	
CHC 9713	103,5		B	
CF 49	105,5		B	
FT 91-1249	5		43,7	A
TB 9401		50,0	A	
145 CHC 9703		65,2	A	
CF 68		76,5	A	
Pérola (PMS)		100,0	B	
VI 4599		100,8	B	
IPR Uirapuru		111,0	B	
Sogro Daniel		121,4	C	
SCS Guará	124,4	C		

CV= Coeficiente de variação

* Médias com letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 7. Resultado do teste de agrupamento de médias Scott Knott 5% para a porcentagem do índice de doença (ID) das cultivares de feijoeiro em relação ao cv. Pérola, avaliados 15 dias após a inoculação de *U. appendiculatus*.

Genótipos	Experimentos	%ID	Resultado do teste*	CV%	
AL 9021332	1	6,3	A	29,8	
CF 28 Abelardo Luz		45,2	A		
BRS Valente		60,2	B		
Pérola (PMS)		100,0	B		
FT 9901		100,0	B		
FT Paulistinha		132,4	B		
CHC 97-29		173,0	B		
Becker Bela Vista		180,0	B		
BR IPA-11 Brídida	2	16,1	A		34,0
Ivo Risolis Wittmarsum		25,0	A		
Pérola (PMS)		100,0	B		
LP 97-04		630,2	C		
MD 841	3	45,0	A	18,4	
SEL. CP9310635		79,8	B		
FT Soberano		98,2	B		
Rudá		113,2	B		
Pérola (PMS)		100,0	B		
CF 69 Caíbi		127,0	B		
CF 73 Piratuba		128,4	B		
CI 96712V		150,1	B		
FT 84113		174,1	B		
CHC 90-1535		262,8	C		
Pérola (PMS)	4	100,0	A	11,0	
Carioca		161,2	A		
CHC 9713		169,2	A		
LH 11		173,0	A		
IPR Juriti		248,3	B		
CHP 97-04		260,0	B		
LP 98-05		297,0	B		
CF 49		514,2	C		
Tahyu		608,0	C		
FT 91-1249	5	41,2	A		20,0
CHC 9703		92,8	B		
CF 68		96,4	B		
Pérola (PMS)		100,0	B		
TB 9401		128,8	B		
VI 4599		154,8	B		
Sogro Daniel		263,4	C		
IPR Uirapuru		178,7	C		
SCS Guará		371,8	D		

CV = Coeficiente de variação

Os dados foram transformados para $\log x + 1$

* Médias com letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste realizado.

Anexo 8. Análise de variância do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²) e diâmetro das pústulas (DP) no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*.

NP/cm ²					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
Cultivares	2	4,90396	2,45198	42,9537	0,001
Tratamento	1	0,06805	0,06805	1,1921	0,278
Cultivares*Tratamento	2	0,09620	0,04810	0,8426	0,434
Erro	72	4,11007	0,05708		
DMP					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
Cultivares	2	0,2782	0,1391	21,99	0,001
Tratamento	1	0,2114	0,2114	33,43	0,001
Cultivares*Tratamento	2	0,0077	0,0039	0,61	0,349
Erro	54	0,3414	0,0063		

^a Dados transformados em $\log x + 1$

^b Dados transformados em $\log x$

GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado.

Anexo 9. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% do número de pústulas por centímetro quadrado (NP/cm²) no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*.

Genótipos	NP/cm ²	Resultado do teste*	CV%
BR IPA-11 Brígida	0,354	A	27,0
Pérola	0,926	B	
IPR Juriti	1,309	B	

CV = Coeficiente de variação.

* Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 10. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% do diâmetro médio das pústulas no primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*.

Fontes de variação			
Cultivares	DMP (µm)	Resultado do teste*	CV%
BR IPA-11 Brígida	381,2	A	4,4
Pérola	460,8	B	
IPR Juriti	553,6	B	
Tratamentos			
Testemunha	528,3	A	4,0
Ulvana	402,1	B	

CV = Coeficiente de variação.

* Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 11. Análise de variância da porcentagem da germinação de uredósporos e número de apressórios de *U. appendiculatus* sob o primeiro trifólio em cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de e avaliados 48 horas após a inoculação.

Germinação de uredósporos ^a					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
Cultivares	2	0,07979	0,03990	4,163	0,042
Tratamentos	1	0,00221	0,00221	0,231	0,639
Cultivares * Tratamentos	2	0,03536	0,01768	1,844	0,200
Erro	12	0,11501	0,00958		
Número de apressórios ^b					
Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
Cultivares	2	0,01495	0,00748	0,259	0,776
Tratamentos	1	0,00075	0,00075	0,026	0,874
Cultivares * Tratamentos	2	0,03027	0,1513	0,523	0,605
Erro	12	0,34690	0,02891		

^a Dados transformados em raiz de x

^b Dados transformados e arcsin de x

GL=graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrado médio; Fc= F-teste calculado; P=probabilidade de $F_c \leq F$ - teste esperado.

Anexo 12. Resultado do teste de separação de média LSD (5%) da porcentagem da germinação de uredóporos e formação de apressórios sobre o primeiro trifólio em cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus* e avaliados 48 horas após a inoculação.

Cultivares	% germinação	Resultado do teste	CV%
BR IPA-11 Brígida	79,22	A	14,0
Pérola	54,45	B	
IPR Juriti	58,68	B	

CV = Coeficiente de variação.

* Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 13. Análise de variância da atividade da enzima peroxidase 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
Cultivares	2	8,56	4,28	5,363	0,015
Tratamentos	1	0,74	0,74	0,927	0,350
Cultivares * Tratamentos	2	1,01	0,51	0,636	0,540
Erro	17	13,56	0,79		

^a Os dados foram transformados em \sqrt{x} .

GL=graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrado médio; Fc= F-teste calculado; P=probabilidade de $F_c \leq F$ - teste esperado.

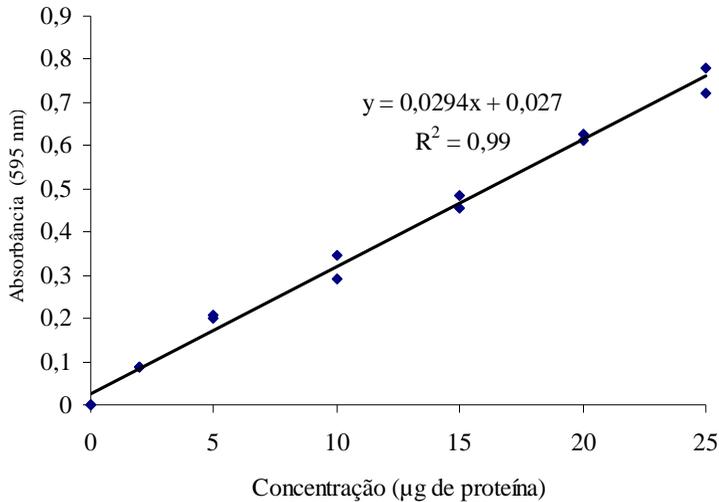
Anexo 14. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% da atividade de peroxidase 48 horas após a inoculação de *U. appendiculatus* em folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação.

Cultivares	Densidade óptica (/mg proteína)	Resultado *	CV%
BR IPA – 11 Brígida	36,31	A	12,0
Pérola	41,23	AB	
IPR Juriti	55,08	B	

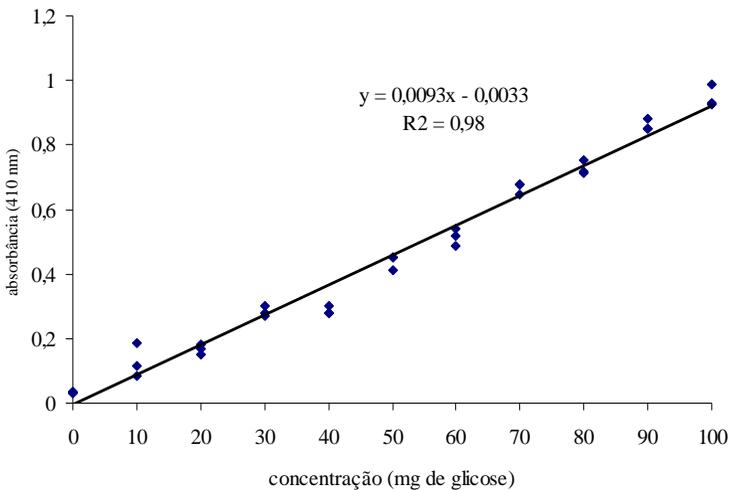
CV = Coeficiente de variação.

* Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 15. Curva padrão e equação da concentração de proteína utilizando BSA como proteína padrão e reagente de BRADFORD diluído.



Anexo 16. Curva padrão e equação da concentração de glicose.



Anexo 17. Análise de variância da atividade de glucanases (μ Katal/mg de proteína) nos folíolos do primeiro trifólio, determinada 48 horas após a inoculação com *U. appendiculatus*, nas cultivares de feijoeiro comum (*P. vulgaris*) do grupo comercial carioca: Pérola, IPR Juriti e BR IPA-11 Brígida pulverizados com o polissacarídeo ulvana (10 mg/mL), 6 e 3 dias antes da inoculação.

Fontes de variação	GL	SQ	QM	Fc	P
Cultivares	2	0,2086	0,1043	5,227	0,018
Tratamentos	1	0,0002	0,0002	0,012	0,913
Cultivares * Tratamentos	2	0,1756	0,0878	4,401	0,031
Erro	15	0,2993	0,0200		

^a Dados transformados em log x.

H.A.I.= horas após a inoculação; GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrado médio; Fc= F-teste calculado; P=probabilidade de $F_c \leq F$ - teste esperado.

Anexo 18. Resultado do teste de separação de médias Tukey 5% da atividade de glucanases em folíolos do primeiro trifólio das cultivares de feijoeiro do grupo carioca BR IPA – 11 Brígida, IPR Juriti e Pérola, pulverizados com ulvana (10 mg/mL) 6 e 3 dias antes da inoculação de *U. appendiculatus*, avaliados 48 horas após a inoculação.

Cultivares	Testemunha	Ulvana*	CV%
BR IPA- 11 Brígida	193,6 abc	139,2 a	9,0
Pérola	153,0 ab	292,1 cd	
IPR Juriti	335,2 d	243,0 bcd	

CV = Coeficiente de variação.

* Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.