

**Mateus Brusco de Freitas**

**Mecanismos de resistência e eficiência de formulações de ulvana no controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**

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

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

**Florianópolis, 2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

F866m Freitas, Mateus Brusco de  
Mecanismos de resistência e eficiência de formulações  
de ulvana no controle da antracnose (*Colletotrichum  
lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)  
[dissertação] / Mateus Brusco de Freitas ; orientador,  
Marciel João Stadnik. - Florianópolis, SC, 2010.  
101 p.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de  
Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Feijão comum. 3.  
*Colletotrichum lindemuthianum*. 4. Antracnose. 5. *Ulva  
fasciata*. 6. Indução de resistência. 7. *Ulvana*. I. Stadnik,  
Marciel Joao. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.  
III. Título.

CDU 631

# TERMO DE APROVAÇÃO

## MATEUS BRUSCO DE FREITAS

### Mecanismos de resistência e eficiência de formulações de ulvana no controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)

Dissertação julgada e aprovada em 05/02/2010, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Comissão Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

#### COMISSÃO EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marciel João Stadnik  
Presidente e Orientador (CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Américo Wordell Filho  
Membro (EPAGRI/SC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero  
Membro (CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis  
Coordenador do Programa

Florianópolis, fevereiro de 2010



## **DEDICO**

Aos meus pais, Pedro Ferreira de Freitas e Maria Justina Brusco de Freitas pelo carinho, educação, incentivo e apoio para realização deste trabalho;

A minha irmã, Maiara Brusco de Freitas pelo carinho, amizade e incentivo;

A minha tia Lúcia Marina Brusco e ao meu tio Antônio Brusco pelo carinho, amizade e apoio;

A Deus.



## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Professor Marciel João Stadnik, pelos ensinamentos, orientação e incentivo em todas as etapas do trabalho;

Aos Professores do Curso, pelos ensinamentos;

À pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Cláudia Conti Medugno pelo preparo dos tratamentos utilizados neste trabalho e pela orientação;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia pela convivência e amizade, Adrielle, Betina, Bruno, Danila, Diego, Leandro, Leonardo, Maíra, Rafael, Prof. Robson, Valdenir e Zamira;

Aos meus amigos Diego, Aline e Francieli pelo carinho, amizade e apoio;

A toda minha família pelos bons momentos que vieram e que ainda estão por vir;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE ANEXOS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xix
RESUMO .....	xx
ABSTRACT .....	xxi
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1. Geral.....	2
2.2. Específicos .....	2
3. HIPÓTESES .....	2
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
4.1. A cultura do feijoeiro .....	3
4.2. Antracnose do feijoeiro.....	4
4.3. Etiologia.....	4
4.4. Processo infeccioso .....	5
4.5. Controle da antracnose do feijoeiro .....	5
4.5.1. Resistência genética no hospedeiro .....	7
4.5.1.1. Reação de hipersensibilidade .....	8
4.6. Indução de resistência .....	10
4.7. Peroxidases .....	11
4.8. Glucanases .....	12
4.9. A Utilização de algas marinhas.....	12
4.9.1. Ulvana .....	14
4.10. Formulações de produtos fitossanitários.....	15
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
5.1. Condições de cultivo de feijoeiro.....	19
5.2. Obtenção e aplicação da ulvana .....	19

5.3. Origem, manutenção e produção do inóculo .....	20
5.4. Inoculação das plantas com <i>C. lindemuthianum</i> .....	21
5.5. Avaliação da severidade da antracnose .....	21
5.6. Mecanismos bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose .....	22
5.6.1. Monitoramento da atividade de peroxidases .....	23
5.6.2. Monitoramento da atividade de $\beta$ -1,3-glucanases .....	23
5.6.3. Quantificação do conteúdo de proteínas.....	24
5.6.4. Avaliação do processo infeccioso .....	24
5.6.5. Detecção da reação de hipersensibilidade .....	25
5.7. Influência de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana.....	26
5.7.1. Preparo dos tratamentos .....	26
5.7.2. Avaliação dos tratamentos.....	26
5.8. Delineamento experimental e análise estatística.....	27
6. RESULTADOS .....	29
6.1. Mecanismos bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose .....	29
6.1.1. Severidade da antracnose .....	29
6.1.2. Peroxidases.....	31
6.1.3. Glucanases.....	32
6.1.4. Germinação de conídios e formação de apressórios de <i>C. lindemuthianum</i> .....	34
6.1.5. Reação de hipersensibilidade .....	35
6.2. Influência de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana.....	36
7. DISCUSSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
9. ANEXOS.....	64

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Conjunto de cultivares diferenciadoras de feijoeiro para a identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum*...7
- Tabela 2.** Principais fontes de resistência ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum* utilizadas em programas de melhoramento de *Phaseolus vulgaris*.....8
- Tabela 3.** Principais formulações de produtos fitossanitários encontradas no mercado.....16
- Tabela 4.** Caracterização e evolução dos estádios fenológicos para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivado em condições de casa-de-vegetação.....19
- Tabela 5.** Escala descritiva da severidade da antracnose do feijoeiro...22
- Tabela 6.** Esquema dos tratamentos utilizados no estudo dos mecanismos de defesa bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose.....27
- Tabela 7.** Esquema dos tratamentos utilizados no estudo do efeito de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana no controle da antracnose do feijoeiro.....28
- Tabela 8.** Atividade de peroxidases, avaliada no primeiro trifólio, em linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, 12, 24 e 48 horas após a inoculação, em plantas inoculadas ou não com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....32
- Tabela 9.** Atividade de glucanases, avaliada no primeiro trifólio, em linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, 12, 24 e 48 horas após a inoculação, em plantas inoculadas ou não com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....33
- Tabela 10.** Porcentagem de germinação de conídios e formação de apressórios, em relação ao número de conídios germinados, da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* sobre a superfície foliar de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, pulverizadas ou não com ulvana, 12, 24 e 48 horas após a inoculação...34

**Tabela 11.** Número de células com reação de hipersensibilidade/cm<sup>2</sup> na superfície foliar de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, pulverizadas ou não com ulvana, 12, 24 e 48 horas após a inoculação com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....35

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura dos dois principais dissacarídeos constituintes da ulvana.....14
- Figura 2.** Severidade da antracnose aos 11 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) avaliadas no segundo trifólio (efeito local) e terceiro trifólio (efeito sistêmico) de plantas resistentes e suscetíveis de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, pulverizadas ou não com ulvana.....30
- Figura 3.** Reação de hipersensibilidade, 4 DPI e sintomas da antracnose em nervuras das faces abaxial representando as notas 4, 5 e 6 (Rava *et al.*, 1993), em plantas de feijoeiro cv. IPR Uirapuru, 9 dias após a inoculação com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....31
- Figura 4.** Germinação de conídios da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, acúmulo de peróxido de hidrogênio e reação de hipersensibilidade em plantas de *Phaseolus vulgaris*, detectada utilizando a diaminobenzidina (DAB), 24 horas após a inoculação.....36
- Figura 5.** Severidade da antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) avaliadas no primeiro e segundo trifólios de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru pulverizadas com ulvana (10mg/mL) e as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL), avaliadas aos 0 e 4 meses após o preparo dos tratamentos.....38



## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose aos 11 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o segundo trifólio (efeito local) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....64
- Anexo 2.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose aos 11 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o segundo trifólio (efeito local) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratada com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....64
- Anexo 3.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose aos 11 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o terceiro trifólio (efeito sistêmico) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....65
- Anexo 4.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose aos 11 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o terceiro trifólio (efeito sistêmico) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratada com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....65
- Anexo 5.** Curva padrão utilizando BSA (Albumina de soro bovino) e equação, utilizadas para o cálculo do conteúdo de proteínas em amostras retiradas para a avaliação de peroxidases.....66
- Anexo 6.** Curva padrão utilizando BSA (Albumina de soro bovino) e equação, utilizadas para o cálculo do conteúdo de proteínas em amostras retiradas para a avaliação de glucanases.....66

**Anexo 7.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de peroxidases ( $\Delta$  Abs. 470nm/min/mg Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....67

**Anexo 8.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de peroxidases ( $\Delta$  Abs. 470nm/min/mg Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e não inoculadas.....68

**Anexo 9.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de glucanases (Absorbância a 600nm/mg de Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....69

**Anexo 10.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de glucanases (Absorbância a 600nm/mg de Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e não inoculadas.....70

**Anexo 11.** Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de germinação de conídios da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana.....71

**Anexo 12.** Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de formação de apressórios da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana.....72

**Anexo 13.** Análise de variância (ANOVA) para o número de células com reação de hipersensibilidade/cm<sup>2</sup>, avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), em linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....73

**Anexo 14.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas no momento do preparo dos tratamentos (agosto de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....74

**Anexo 15.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas no momento do preparo dos tratamentos (agosto de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....75

**Anexo 16.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas quatro meses após o preparo dos tratamentos (dezembro de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....76

**Anexo 17.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas quatro meses após o preparo dos tratamentos (dezembro de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....77

**Anexo 18.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas oito meses após o preparo dos tratamentos (abril de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....78

**Anexo 19.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas oito meses após o preparo dos tratamentos (abril de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....79

**Anexo 20.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas 12 meses após o preparo dos tratamentos (agosto de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....80

**Anexo 21.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas 12 meses após o preparo dos tratamentos (agosto de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.....81

## LISTA DE ABREVIATURAS

AACPD - Área abaixo da curva do progresso da doença  
APH – Acúmulo de peróxido de hidrogênio  
ANOVA – Análise de variância  
AP – Apressório  
BDA - Batata-dextrose-ágar  
BSA - Albumina de soro bovino  
CH – Célula Hipersensitiva  
*Cl* – *Colletotrichum lindemuthianum*  
CO – Conídio  
DAB - Diaminobenzidina  
DAI - Dias antes da inoculação  
DPI - Dias pós-inoculação  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ES - Estômato  
GLU - Glucanases  
HAI - Horas após a inoculação  
ISR – Resistência sistêmica induzida  
NS - Não significativo  
POX - Peroxidases  
PR – Proteína relacionada à patogênese  
RH – Reação de hipersensibilidade  
SAR – Resistência sistêmica adquirida  
SA – Sintomas da antracnose  
TG - Tubo germinativo

## **Mecanismos de resistência e eficiência de formulações de ulvana no controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*)**

### **RESUMO**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os mecanismos de defesa bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência inata do feijoeiro à antracnose, compará-los com aqueles induzidos pela aplicação foliar de ulvana e avaliar o efeito de inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana. Para a avaliação dos mecanismos de defesa, plantas resistentes e suscetíveis de *P. vulgaris* cv. Uirapuru foram tratadas, 6 e 3 dias antes da inoculação (DAI), com água (testemunha) ou ulvana (10mg/mL) e inoculadas com *C. lindemuthianum* no estágio fenológico V4. A severidade da antracnose foi avaliada em intervalos de 2 dias. As atividades de peroxidases e glucanases foram determinadas às 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) em folíolos do primeiro trifólio. A germinação de conídios, formação de apressórios de *C. lindemuthianum* e a reação de hipersensibilidade (RH) em plantas de *P. vulgaris* foram avaliadas às 12, 24 e 48 HAI em discos foliares retirados do primeiro trifólio. Para a avaliação do efeito de diferentes inertes, foram realizados quatro experimentos idênticos durante o período de 1 ano. Para tanto, plantas de *P. vulgaris* cv. Uirapuru foram tratadas, 6 e 3 DAI, com água destilada ou ulvana (10mg/mL) (testemunhas) ou com as formulações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita e inoculadas com *C. lindemuthianum* no estágio fenológico V4. Plantas resistentes não apresentaram sintomas da antracnose, sendo que, 4 DPI foram visualizados pequenos pontos necróticos caracterizando a RH. O efeito local da ulvana foi mais evidente que o sistêmico. A atividade de POX foi sempre maior em plantas resistentes, mas a atividade de GLU foi similar. A pulverização de ulvana elevou a atividade de POX e GLU tanto em plantas inoculadas quanto em não inoculadas. A germinação e a formação de apressórios do fungo não foram alteradas pela resistência inata ou pela aplicação de ulvana. O número de células hipersensitivas foi maior em plantas resistentes e menor em plantas tratadas com ulvana, quando comparadas com os respectivos controles. A eficiência da ulvana foi reduzida pela formulação contendo atapulgita, mas não pela que continha sílica amorfa ou caulinita.

**Resistance mechanisms and efficiency of formulations of ulvan in the control of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in bean (*Phaseolus vulgaris*)**

**ABSTRACT**

The present work aimed to evaluate the biochemical and histological defense mechanisms involved in the innate resistance of green bean to anthracnose, to compare them with the mechanisms induced by the foliar application of ulvan and to evaluate the effect of inerts in the storability and efficiency of ulvan. To evaluate the defense mechanisms, resistant and susceptible bean plants (*P. vulgaris*, cv. Uirapuru) were treated, 6 and 3 days before inoculation (DBI), with water (control) or ulvan (10mg/mL) then inoculated with *C. lindemuthianum* on V4 growth stage. The severity of anthracnose was evaluated every 2 days. The peroxidases and glucanases activity were determined in leaflets from the first trifoliolate at 12, 24 and 48 hours after inoculation (HAI). Conidial germination, apressoria formation of *C. lindemuthianum* and hypersensitive response in bean plants were evaluated in discs from leaflets of the first trifoliolate at 12, 24 and 48 HAI. To evaluate the effect of different inerts, four identical experiments were performed during a year period. Bean plants cv. Uirapuru were treated, 6 and 3 DBI, with distilled water or ulvan (controls) or with the formulations of ulvan with the inerts kaolinite, amorphous silica or attapulgite, then inoculated with *C. lindemuthianum* on V4 growth stage. The resistant line did not show any anthracnose symptoms, but 4 days DPI little necrotic spots characterizing the hypersensitive response were observed. Local effect of ulvan was more evident than the systemic ones. POX activity always was higher in resistant plants, but GLU activity was similar on both resistant and susceptible plants. Ulvan increased POX and GLU activity in non- and -inoculated bean plants. Both innate and ulvan-induced resistance did not affect conidial germination and apressoria formation of *C. lindemuthianum*. Hypersensitive response was higher in resistant line than in the susceptible one, but lower in ulvan-treated plants, when compared with controls. The efficiency of ulvan was reduced by formulation with attapulgite, but not by the formulations with kaolinite or amorphous silica.



## **1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, com uma produção superior a 3 milhões de toneladas na safra de 2007, porém esta cultura ainda apresenta baixa produtividade média, cerca de 836kg/ha na safra de 2007 (FAO, 2009), decorrente, principalmente, de perdas ocasionadas por doenças. Dentre essas, a antracnose é considerada uma das principais, podendo causar perdas de até 100%, quando são utilizadas sementes infectadas e as condições de temperatura e umidade relativa do ar são favoráveis.

A antracnose do feijoeiro é uma doença difícil de ser controlada, pois o patógeno apresenta alta variabilidade genética, pode sobreviver em restos culturais e é transmitido pela semente. Os principais métodos de controle utilizados atualmente são: práticas culturais, controle químico e utilização de cultivares resistentes. A utilização de cultivares resistentes tem sido o método mais apropriado. No entanto, a grande variabilidade genética do fungo vem dificultando o desenvolvimento de cultivares com uma resistência genética duradoura.

A exigência crescente dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos aliada ao aumento nos custos da produção, contaminação do ambiente e a ocorrência de microorganismos resistentes, vem levando a uma necessidade de se utilizar métodos alternativos para o controle de doenças. Neste contexto, a indução de resistência tem se mostrado uma alternativa promissora e complementar ao controle químico e genético convencional. Dentre os indutores, os polissacarídeos obtidos de algas marinhas, tal como a ulvana, vem demonstrando potencial para eliciar respostas de defesa em feijoeiro contra a antracnose. Considerando que pouco se sabe sobre como e quais fases do processo infeccioso são afetadas pela resistência inata e pela induzida por ulvana, este trabalho foi desenvolvido para avaliar os mecanismos de defesa bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência inata do feijoeiro à antracnose, compará-los com aqueles induzidos pela aplicação foliar de ulvana e avaliar o efeito de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar os mecanismos de defesa bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência inata do feijoeiro à antracnose, compará-los com aqueles induzidos pela aplicação foliar de ulvana, bem como avaliar o efeito de diferentes inertes sobre a armazenabilidade e eficiência da ulvana.

### **2.2. Específicos**

-Avaliar o efeito da aplicação foliar de ulvana na severidade da antracnose;

-Monitorar a atividade das enzimas peroxidases e glucanases em plantas resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana ou não e inoculadas ou não com o fungo *C. lindemuthianum*;

-Avaliar microscopicamente a germinação de conídios, formação de apressórios de *C. lindemuthianum* e a reação de hipersensibilidade após a inoculação de plantas resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana;

-Avaliar o efeito de diferentes inertes sobre a armazenabilidade e eficiência da ulvana.

## **3. HIPÓTESES**

-Plantas de *Phaseolus vulgaris* resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana respondem de modo diferenciado à infecção por *Colletotrichum lindemuthianum*;

-Diferentes inertes influenciam a eficiência e a armazenabilidade da ulvana.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. A cultura do feijoeiro

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, subfamília Faboideae (VILHORDO *et al.*, 1996). Dentre as mais de 70 espécies constituintes do gênero *Phaseolus*, *P. vulgaris* apresenta a distribuição mais ampla ao redor do mundo. Entre as cinco espécies domesticadas (*Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus dumosus* Macfad., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* A. Gray e *Phaseolus lunatus* L.) *P. vulgaris* é responsável por cerca de 85% da produção (SINGH, 2001; ACOSTA-GALLEGOS; KELLY; GEPTS, 2007). A domesticação do feijoeiro ocorreu a aproximadamente 7000 anos em dois centros de origem, na Mesoamérica (México e América Central) e na região dos Andes (sul do Peru, Bolívia e América Central) (SINGH, 2001).

*P. vulgaris* é também a espécie mais consumida do gênero (ACOSTA-GALLEGOS; KELLY; GEPTS, 2007), constituindo uma importante fonte de proteínas e calorias na dieta humana, principalmente em países em desenvolvimento (YOKOYAMA; BANNO; KLUTHCOUSKI, 1996). No Brasil, o feijão constitui-se no alimento básico para a maioria da população, independente da classe social. O feijão representa para o brasileiro uma importante fonte de diversos nutrientes, são eles: proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996).

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão (mais de 3 milhões de toneladas na safra de 2007), seguido de Índia, EUA, Míamar e México (FAO, 2009). Dentre as regiões produtoras no País, a região Sul se destaca, contribuindo com 35% da produção na safra de 2007, seguida das regiões Nordeste (25%) e Sudeste (25%) (IBGE, 2008). Dentro da região sul, o Estado do Paraná foi responsável pela maior contribuição na produção regional em 2007, com 69%, seguido dos Estados de Santa Catarina (20%) e Rio Grande do Sul (11%) (IBGE, 2008).

A cultura do feijoeiro ainda apresenta uma baixa produtividade média, cerca de 836kg/ha na safra de 2007, se comparado com países como Estados Unidos (1.923kg/ha), Irlanda (5.312kg/ha) e Barbados (5.275kg/ha) (FAO, 2009), decorrente, principalmente, de perdas ocasionadas por doenças (FERNANDES, 2007).

## 4.2. Antracnose do feijoeiro

A antracnose do feijoeiro comum, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das principais doenças dessa cultura, atacando cultivares suscetíveis em todo o mundo (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988).

As perdas causadas pela antracnose podem chegar a 100%, quando são utilizadas sementes infectadas e as condições de temperatura e umidade relativa do ar são favoráveis (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994). Além da redução no rendimento da cultura, o fungo, quando infecta a semente, causa a depreciação da qualidade do produto, por causar manchas nos grãos (SARTORATO *et al.*, 1996). Temperaturas moderadas a frias, entre 13 e 26°C, com um ótimo a 18°C, acompanhadas de elevada umidade relativa do ar favorecem o desenvolvimento da doença (CHAVES, 1980; DOURADO NETO; FANCELLI, 2000).

A disseminação do patógeno ocorre, a longas distâncias, através de sementes infectadas, enquanto que, a curtas distâncias, principalmente por respingos de água da chuva. *C. lindemuthianum* pode sobreviver de uma safra a outra como micélio dormente dentro do tegumento de sementes ou em restos culturais (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988).

Os sintomas da antracnose podem ser visualizados em toda a parte aérea da planta. Nas folhas, as lesões ocorrem inicialmente na face abaxial, ao longo das nervuras, como manchas de cor parda-avermelhada evoluindo para lesões de cor café-escuro à negra. Nos pecíolos e no caule, as lesões são ovaladas, deprimidas e de coloração escura (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994). Nas vagens, as lesões são arredondadas e deprimidas, de coloração marrom, com os bordos escuros e salientes, circundadas por um anel de coloração parda-avermelhada, podendo apresentar o centro de coloração clara ou rosada, devido à esporulação do fungo (SARTORATO, 1988; BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 1997).

## 4.3. Etiologia

*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner é um fungo mitospórico cujo teleomorfo corresponde a *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk f. sp. *phaseoli* (SUTTON, 1992; JERBA; RODELLA; FURTADO, 2005; THAUNG, 2008). O fungo produz micélio septado e ramificado de coloração hialina à negra, à medida que envelhece. Os conídios são unicelulares e de coloração hialina, com um tamanho de 4 a 5µm x 13 a 22µm, podendo ser arredondados,

cilíndricos, oblongos ou em forma de S, com as pontas arredondadas ou levemente pontiagudas (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994). Os conídios são produzidos no interior de acérvulos e sobre conidióforos de coloração hialina, eretos e ramificados, que medem de 40 a 60µm, as estruturas apresentam-se envolvidas por uma massa gelatinosa de cor rosa ou salmão (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988).

#### **4.4. Processo infeccioso**

*C. lindemuthianum* é um fungo hemibiotrófico, apresentando um processo infeccioso dividido em duas fases, uma fase inicial, biotrófica, que ocorre de 2 a 4 dias após a infecção, onde o patógeno se estabelece no hospedeiro não havendo presença de sintomas visíveis e, outra fase, necrotrófica, onde ocorrem os sintomas (BAILEY *et al.*, 1992; O'CONNELL *et al.*, 2000).

Os conídios de *C. lindemuthianum* germinam, de 6 a 9h após a deposição e a adesão à superfície foliar, formando de um a quatro tubos germinativos. A diferenciação do apressório acontece quando o tubo germinativo para de crescer e sua ponta incha, tornando-se delimitada por um septo (PERFECT *et al.*, 1999). Em seguida, ocorre a maturação do apressório, onde são formadas novas camadas de parede celular, poros de penetração, deposição de melanina e substâncias mucilaginosas (BAILEY *et al.*, 1992; PERFECT *et al.*, 1999; O'CONNELL *et al.*, 2000). A penetração ocorre de forma mecânica, onde três mecanismos de penetração foram propostos: força mecânica, secreção de enzimas responsáveis pela degradação de cutina e a combinação dos anteriores (BAILEY *et al.*, 1992).

Após a penetração, inicia-se a fase biotrófica onde, o fungo coloniza os tecidos formando uma extensa hifa primária intracelular e vesículas de infecção em células invadidas, que, permanecem vivas. A fase necrotrófica inicia-se com a formação de hifas secundárias que, se ramificam intra e extracelularmente e matam rapidamente as células do hospedeiro (BAILEY *et al.*, 1992; O'CONNELL *et al.*, 2000).

#### **4.5. Controle da antracnose do feijoeiro**

A antracnose do feijoeiro é uma doença difícil de ser controlada, pois o patógeno apresenta alta variabilidade genética, pode sobreviver em restos culturais e é transmitido pela semente (RAVA *et al.*, 1993; SARTORATO *et al.*, 1996).

Os principais métodos de controle utilizados atualmente são: práticas culturais, controle químico e utilização de cultivares resistentes (SARTORATO *et al.*, 1996; SARTORATO; RAVA; FARIA, 2009).

Dentre as práticas culturais recomendadas para o controle da antracnose, encontram-se a utilização de sementes livres de patógeno, a rotação de culturas, a eliminação dos restos culturais, a utilização de uma densidade de semeadura adequada e a eliminação de sementes que apresentem manchas ou defeitos (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988; SCHWARTZ, 1994; SARTORATO *et al.*, 1996; SARTORATO; RAVA; FARIA, 2009).

O controle químico da antracnose pode ser realizado através do tratamento das sementes ou da pulverização de fungicidas a campo. O tratamento de sementes com fungicidas sistêmicos pode inviabilizar esporos e/ou micélio do fungo presentes no interior da semente (SARTORATO, 1988; SARTORATO *et al.*, 1996). Fungicidas protetores e sistêmicos podem ser utilizados no controle da antracnose, sendo que, ao aparecimento dos primeiros sintomas, deve-se iniciar o tratamento. Dentro dos fungicidas utilizados, pode-se citar o mancozeb, oxiclureto de cobre e o tiofanato metílico (CHAVES, 1980; SARTORATO, 1988; SARTORATO *et al.*, 1996).

A utilização de cultivares resistentes no controle da antracnose tem sido o método mais apropriado, pois permite a redução nos custos da produção e uma diminuição da contaminação do ambiente e do consumidor (TALAMINI *et al.*, 2004; LOFFAGUEN; TALAMINI; STADNIK, 2005). No entanto, a grande variabilidade genética existente no fungo vem dificultando o desenvolvimento de cultivares com uma resistência genética duradoura (RAVA *et al.*, 1993; TALAMINI *et al.*, 2004). *C. lindemuthianum* foi o primeiro patógeno vegetal para o qual foram descritas raças fisiológicas (BARRUS, 1918 citado por BEEBE; PASTOR-CORRALES, 1991). A partir de então, iniciaram-se os trabalhos de identificação de raças deste fungo, culminando com a designação de várias raças ao redor do mundo (CHAVES, 1980; RAVA *et al.*, 1993). Entretanto, as cultivares utilizadas na identificação não eram as mesmas, o que dificultava o intercâmbio de resultados. Tal problema foi resolvido na Primeira Reunião Latino Americana da Antracnose do feijoeiro, realizada no CIAT (Cali, Colômbia), onde foi definida a utilização de um sistema binário de identificação e padronizado um grupo de 12 cultivares diferenciadoras (Tabela 1). Cada cultivar possui um valor binário e, por meio da expansão binomial e da soma destes valores, é determinada a raça (PASTOR-CORRALES, 1991). A raça 73 de

*C. lindemuthianum* é patogênica às seguintes cultivares diferenciadoras: Michelite, Cornell 49-242 e México 222 (LOFFAGUEN *et al.*, 2005).

**Tabela 1.** Conjunto de cultivares diferenciadoras de feijoeiro para a identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum*\*.

Cultivares Diferenciadoras	Série Binomial	Valor Binário
Michelite	2 <sup>0</sup>	1
Michigan Dark Red Kidney	2 <sup>1</sup>	2
Perry Marrow	2 <sup>2</sup>	4
Cornell 49-242	2 <sup>3</sup>	8
Widusa	2 <sup>4</sup>	16
Kaboon	2 <sup>5</sup>	32
México 222	2 <sup>6</sup>	64
PI 207262	2 <sup>7</sup>	128
TO	2 <sup>8</sup>	256
TU	2 <sup>9</sup>	512
AB 136	2 <sup>10</sup>	1024
G2333	2 <sup>11</sup>	2048

\*Adaptado de Pastor-Corrales (1991).

#### 4.5.1. Resistência genética no hospedeiro

A utilização de cultivares resistentes é a mais efetiva das medidas de controle, além de ser mais barata e mais fácil de ser adotada pelos agricultores (MAHUKU *et al.*, 2002). A resistência inata de *P. vulgaris* à antracnose é do tipo monogênica e raça-específica. Este tipo de resistência é conhecida como resistência vertical e é conferida por um único gene dominante, genes duplicados ou complementares, conhecidos com genes R, responsáveis pelo reconhecimento do patógeno, sendo que não existem genes que conferem resistência a todas as raças conhecidas do fungo (MAHUKU *et al.*, 2002; AGRIOS, 2005).

A resistência vertical atua na redução do desenvolvimento da doença afetando o inóculo inicial do patógeno (AGRIOS, 2005). No ano de 1955, Herold Henry Flor, utilizando o patossistema linho-*Melanpsora lini* (Pers.) (agente causal da ferrugem do linho), propôs a existência de um sistema de reconhecimento do tipo gene-a-gene, onde a reação é incompatível (ausência de sintomas) quando o hospedeiro possui um gene dominante de resistência “R” e o patógeno possui um gene dominante de avirulência “avr” correspondente (VAN DER PLANK, 1975; BARBIERI; CARVALHO, 2001; AGRIOS, 2005).

Várias fontes de resistência vêm sendo identificadas ao redor do mundo, as principais e os respectivos alelos de resistência são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Principais fontes de resistência ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum* utilizadas em programas de melhoramento de *Phaseolus vulgaris*\*.

Fonte de Resistência	Alelo de Resistência**
Michigan Dark Red Kidney	Co-1 (A)
Kaboon	Co-1 <sup>2</sup>
Perry Marrow	Co-1 <sup>3</sup>
AND 277	Co-1 <sup>4</sup>
Widusa	Co-1 <sup>5</sup>
Cornell 49242 e Blackhawk	Co-2 (Are)
México 222	Co-3 (Mexique-1)
México 227	Co-3 <sup>2</sup> (Mexique-1)
TO	Co-4 (Mexique-2)
G2333	Co-4 <sup>2</sup> (Mexique-2)
PI 207262	Co-4 <sup>3</sup>
TU, G2333, Seleção 1360	Co-5 (Mexique-3)
Catrachita (derivada de AB 136)	Co-6
AB 136	Co-6
G2333 E Seleção 1308	Co-7
AB 136	Co-8
BAT 93	Co-9
Ouro Negro	Co-10

\*Adaptado de VIEIRA *et al.* (2005). \*\*Entre parênteses, nomenclatura antiga de identificação dos alelos de resistência.

No Brasil, o melhoramento visando resistência à antracnose é realizado utilizando como fonte as cultivares Cornell 49242, México 222, TO, TU, PI 207262, AB 136 Ouro Negro, G2333 e Kaboon (VIEIRA *et al.*, 2005).

#### 4.5.1.1. Reação de hipersensibilidade

A resistência de plantas a fungos e bactérias é frequentemente associada à reação de hipersensibilidade (RH), onde ocorre a morte de um número limitado de células em contato direto com o patógeno levando a um bloqueio no desenvolvimento da doença (DIXON;

HARRISON; LAMB, 1994; LOW; MERIDA, 1996; MILOSEVIC; SLUSARENKO, 1996; THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 1997).

Para que ocorra a RH é necessário o reconhecimento do patógeno por parte do hospedeiro. A identificação é realizada através de moléculas elicitoras liberadas pelo patógeno antes ou durante a invasão. Os elicitores podem ser componentes da superfície microbiana (glucanas, quitina ou quitosana) que necessitam da atividade de enzimas do hospedeiro para serem liberados ou podem ser moléculas sintetizadas e liberadas pelo próprio patógeno em resposta a sinais gerados pelo hospedeiro. As moléculas elicitoras são reconhecidas por receptores presentes, geralmente, na parede celular vegetal (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994).

Após o reconhecimento, as células elicidadas sofrem uma série de mudanças, incluindo o acúmulo de transcritos de genes responsáveis pela síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR-1), despolarização e posterior hiperpolarização da membrana plasmática e a explosão oxidativa (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994).

A explosão oxidativa é um dos eventos iniciais durante a reação de hipersensibilidade, onde ocorre a produção de espécies ativas de oxigênio (Active Oxygen Species – AOS's), incluindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O peróxido de hidrogênio possui várias funções importantes no processo de defesa, além de participar do cruzamento oxidativo (*cross-linking*) de proteínas da parede celular, atua como substrato das peroxidases na lignificação e pode atuar como um regulador da reação de hipersensibilidade (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994; MEHDY, 1994; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; IRITI; FAORO, 2003). Milosevic e Slusarenko (1996), estudando o efeito da inoculação de folhas primárias de plantas de *P. vulgaris* com isolados virulentos e avirulentos da bactéria *Pseudomonas syringae* Van Hall pv. *phaseolicola*, observaram que a reação incompatível estava associada com a RH, elevação na atividade de enzimas que utilizam, produzem ou removem o  $H_2O_2$ , tais como peroxidases, xantina oxidases, glutatona redutases e catalases. O acúmulo de peróxido de hidrogênio em plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) contendo o gene de resistência *M1-a3* responsável por conferir resistência por meio de reação de hipersensibilidade contra o isolado A6 do fungo biotrófico *Blumeria graminis* (D.C.) Speer f. sp. *hordei*, ocorreu, em células hipersensitivas, a partir de 15 horas após a inoculação (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 1997).

#### 4.6. Indução de resistência

As plantas são frequentemente expostas a uma grande quantidade de patógenos, o que levou ao desenvolvimento de complexos mecanismos de defesa. De uma maneira geral, as plantas possuem mecanismos físicos e químicos pré-existentes, tais como: camadas de cera, cutícula, adaptações em estômatos e compostos fungitóxicos (AGRIOS, 2005). Além dos mecanismos pré-existentes, plantas possuem mecanismos que são ativados após o reconhecimento do patógeno, os quais envolvem a formação de tiloses, papilas, camadas de cortiça e de abscisão, produção de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e AOS's (STADNIK; MARASCHIN, 2004; AGRIOS, 2005).

A habilidade das plantas se defenderem contra invasores está relacionada à capacidade de detectá-los (CLUZET *et al.*, 2004; STADNIK; MARASCHIN, 2004). A percepção de moléculas sinalizadoras (chamadas de elicitores), que podem ser de natureza química diversa, liberadas pelos patógenos, leva a um desencadeamento de mecanismos de sinalização que, geralmente iniciam com um influxo de cálcio e uma explosão oxidativa, seguido da síntese de moléculas sinalizadoras tais como: ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (CLUZET *et al.*, 2004).

Uma ampla variedade de moléculas pode atuar como elicitores, incluindo oligo- e polissacarídeos, peptídeos, lipídeos e proteínas. Segundo Cluzet *et al.* (2004), um elicitador em potencial deve disparar várias respostas de defesa, não causar grandes alterações no metabolismo primário da planta e assegurar a proteção contra doenças.

A expressão da resistência induzida leva a uma redução no tamanho e/ou número de lesões causadas no hospedeiro pelo patógeno, resultando em um atraso no desenvolvimento da doença. Seus princípios podem ser aplicados na proteção de plantas contra um amplo espectro de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus (HAMMERSCHMIDT, 1999; STADNIK; MARASCHIN, 2004).

A resistência induzida pode ocorrer sistemicamente, quando é expressa em locais não expostos diretamente ao agente indutor e pode ser dividida em duas categorias. A primeira delas, a resistência sistêmica adquirida (Systemic Acquired Resistance – SAR), pode se desenvolver local e sistemicamente em resposta a um patógeno causador de necrose. A SAR caracteriza-se pelo acúmulo de PR-proteínas e é mediada por uma via dependente do ácido salicílico. O segundo tipo de resistência induzida, conhecida como resistência sistêmica induzida (Induced Systemic Resistance – ISR), ocorre sistemicamente em resposta à

colonização das raízes da planta por certas bactérias presentes na rizosfera. A ISR é mediada por uma via envolvendo jasmonato/etileno e não envolve o acúmulo de PR-proteínas (HAMMERSCHMIDT, 1999; STADNIK; MARASCHIN, 2004).

Os indutores de resistência podem ser classificados, quanto à origem, em: bióticos e abióticos. Dentro dos indutores bióticos, pode-se destacar a pré-inoculação com patógenos virulentos e avirulentos e a pulverização com alguns extratos de algas, tais como o de *Laminaria digitata* L. (Iodus 40<sup>®</sup>, Goëmar). Dentro dos indutores abióticos, pode-se destacar a utilização de luz UV, choque térmico, injúrias mecânicas, compostos químicos tais como: fosfatos, derivados do ácido salicílico, ácido 2,6 dicloroisonicotínico e o acibenzolar-S-metil (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

O acibenzolar-S-metil (Bion<sup>®</sup>, Syngenta), um análogo funcional do ácido salicílico (WALTERS; HEIL, 2007), é comercializado no Brasil para controlar a antracnose, além de outras doenças causadas por bactérias e vírus na cultura do feijoeiro (AGROFIT, 2010).

#### 4.7. Peroxidases

As peroxidases (POX) são uma classe de enzimas presentes em tecidos de animais, vegetais e microrganismos que catalizam a redução entre peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e vários redutores (HIRAGA *et al.*, 2001). Além da atividade redutora, as POX participam na lignificação, suberização e metabolismo da parede celular. Elas são divididas em três classes: a classe I agrupa as enzimas intracelulares, a classe II agrupa enzimas secretadas por fungos e a classe III agrupa as enzimas secretadas por plantas (PASSARDI *et al.*, 2005).

Segundo Van Loon e Van Strein (1999) e Van Loon, Rep e Pieterse (2006) as POX são classificadas como Proteínas Relacionadas à Patogênese (Proteínas PR) pertencentes à classe PR-9. Elas são responsáveis pelo espessamento da parede celular vegetal através da deposição de lignina, em resposta ao ataque de patógenos (VAN LOON; VAN STREIN, 1999; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). A inoculação da primeira folha verdadeira de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) com o fungo *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) elevou a atividade de POX na segunda folha. Quando a segunda folha foi inoculada uma semana após a inoculação da primeira, foi observada uma elevação da atividade de POX na terceira folha e sua proteção contra o patógeno (HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KUC, 1982). A inoculação da primeira folha verdadeira de plantas de pepino com o fungo *C. lagenarium*

aumentou a velocidade da lignificação das paredes celulares de células da segunda folha inoculada com *C. lagenarium* ou *Cladosporium cucumerinum* (Ellis & Arthur) (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982).

#### 4.8. Glucanases

As  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) são enzimas que hidrolisam polímeros de  $\beta$ -1,3-glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, são os principais componentes da parede celular dos fungos. Além desta atividade, as glucanases participam em processos fisiológicos das plantas, tais como: fertilização, autólise e remoção de caloses no floema (GUZZO; MARTINS, 1996).

As  $\beta$ -1,3-glucanases são classificadas em 3 classes: a classe I apresenta proteínas básicas localizadas nos vacúolos do mesófilo e células da epiderme, enquanto que as classes II e III são proteínas ácidas localizadas extracelularmente (VAN DEN BULCKE *et al.*, 1989; BEFFA; MEINS Jr., 1996). Segundo Van Loon e Van Strein (1999) e Van Loon, Rep e Pieterse (2006) as GLU são classificadas como Proteínas Relacionadas à Patogênese (Proteínas PR) pertencentes à classe PR-2.

No processo de indução de resistência, uma pequena quantidade de GLU é sintetizada e excretada para o espaço intercelular, e, com o crescimento fúngico neste espaço, esta enzima inicia o processo de degradação da parede celular do fungo, e os fragmentos liberados pela ação da enzima funcionam como elicitores, induzindo à síntese de uma grande quantidade de GLU e quitinases que são acumuladas nos vacúolos. Quando o fungo consegue penetrar na célula, os vacúolos são rompidos e ocorre a liberação destas enzimas, inibindo a ação do patógeno (MAUCH; STAEHELIN, 1989). O tratamento de folhas primárias de *P. vulgaris* com ácido dicloroisocotínico (INA) ou conídios de *C. lindemuthianum* eleva a atividade de glucanases e quitinases na folha primária e no primeiro e segundo trifólios (DANN *et al.*, 1996). A inoculação de hipocótilos de *P. vulgaris* com um isolado não patogênico do fungo *Rhizoctonia solani* (Kuhn) eleva a atividade de peroxidases, glucanases e quitinases, protegendo as plantas contra os fungos *R. solani* e *C. lindemuthianum* (XUE; CHAREST; JABAHI-HARE, 1998).

#### 4.9. A Utilização de algas marinhas

A exigência crescente dos consumidores por alimentos livres de agrotóxicos aliada ao aumento nos custos da produção, contaminação do ambiente e a ocorrência de microorganismos resistentes, vem levando a

uma necessidade de se utilizar métodos alternativos para o controle de doenças. A utilização de extratos de vegetais e de algas marinhas surge como uma alternativa barata e menos agressiva ao homem e ao ambiente (TALAMINI; STADNIK, 2004).

As algas marinhas encontram-se amplamente distribuídas pelos oceanos, sendo que, mais de 150.000 espécies podem ser encontradas, e, apenas algumas destas foram identificadas (LIMA-FILHO *et al.*, 2002). Apesar da grande diversidade existente, pouco se conhece a respeito de suas potencialidades (TALAMINI; STADNIK, 2004). Atualmente, uma grande atenção tem sido dada para a utilização de algas marinhas nas mais diversas áreas da ciência, por elas apresentarem um crescimento rápido e produzirem grande volume de biomassa, além de apresentarem um grande número de compostos com atividade biológica (TALAMINI; STADNIK, 2004; PAULERT *et al.*, 2007; PAULERT *et al.*, 2009).

Algas marinhas representam uma fonte natural e abundante de moléculas com alguma atividade biológica. A pulverização de extratos de algas pode melhorar a germinação de sementes, elevar a produção e os níveis de resistência a doenças (CLUZET *et al.*, 2004; STADNIK; PAULERT, 2007).

No lago Venice (Itália), aproximadamente 1.000.000 de toneladas de biomassa de algas do gênero *Ulva* é produzida anualmente. Cuomo e colaboradores (1995), utilizando proporções entre 70 e 90% de biomassa de *Ulva* no processo de compostagem, obtiveram um composto com características físicas, químicas e biológicas comparáveis àquelas de produtos comerciais utilizados como fertilizantes. A utilização de *Ulva* na produção de fertilizante surge como alternativa para o destino final da grande quantidade da biomassa produzida anualmente em áreas costeiras.

A alga marinha *Ulva fasciata* Delile é uma macroalga pertencente ao filo *Chlorophyta*, ordem Ulvales. Indivíduos dessa espécie são de coloração verde, apresentam talo ereto e achatado, medindo de 2-25cm de comprimento e 1-5,5cm de largura e fixam-se ao substrato por meio de um pequeno apressório (BÖKER-TÔRRES, 2005).

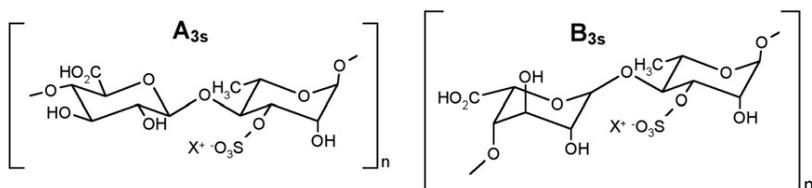
Algas do gênero *Ulva*, conhecidas como alface do mar “Sea Lettuce”, encontram-se amplamente distribuídas ao redor do mundo e vêm sendo utilizadas na alimentação, na medicina e agricultura (PENGZHAN *et al.*, 2003; CLUZET *et al.*, 2004; PAULERT *et al.*, 2007). Indivíduos desta espécie estão frequentemente envolvidos em problemas ecológicos ao longo de áreas costeiras, devido a sua grande proliferação

em ambientes eutrofizados (RAY; LAHAYE, 1995; PAULERT *et al.*, 2007; ROBIC; SASSI; LAHAYE, 2008).

Em um experimento realizado a campo, com a cultivar IPR88 Uirapuru (altamente suscetível à antracnose), a pulverização mensal de extratos de *U. fasciata* e *Aloe vera* (L.) Burman reduziram a severidade da antracnose (55 e 30%, respectivamente), quando comparados com a testemunha (água). O nível de controle atingido pelo extrato de *U. fasciata* (55%) superou o da aplicação de fungicida (50%) (LOFFAGUEN *et al.*, 2004).

#### 4.9.1. Ulvana

A ulvana é um heteropolissacarídeo sulfatado solúvel em água, extraído das paredes celulares de algas marinhas dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*, representando de 8 a 29% do peso seco da alga (LAHAYE; ROBIC, 2007; ROBIC; SASSI; LAHAYE, 2008; PAULERT *et al.*, 2009). Este polissacarídeo é composto por ramnose, xilose, glicose manose, galactose e ácidos urônicos (PENGZHAN *et al.*, 2003; PAULERT *et al.*, 2007; ROBIC; SASSI; LAHAYE, 2008). Os dois principais dissacarídeos repetitivos são ácidos aldobiurônicos designados como tipo A (ácido ulvanobiurônico 3-sulfato) ( $A_{3s}$ ) e tipo B (ácido ulvanobiurônico 3-sulfato) ( $B_{3s}$ ) (Figura 1) (ROBIC; SASSI; LAHAYE, 2008).



**Figura 1.** Estrutura dos dois principais dissacarídeos constituintes da ulvana. Adaptado de Robic, Sassi e Lahaye (2008).

A ulvana induz, em plantas de *Medicago truncatula* (Gaertn.), a expressão de vários genes relacionados com a defesa, dentre eles, genes envolvidos com a biossíntese de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e proteínas da parede celular. Além de ativar a expressão de genes de defesa, este polissacarídeo reduz os sintomas causados pelo fungo *Colletotrichum trifolii* (Bain.), quando pulverizado uma ou duas vezes antes da inoculação (CLUZET *et al.*, 2004).

Extratos solúveis e insolúveis em metanol e ulvana obtidos da alga *U. fasciata* foram avaliados quanto ao seu efeito *in vitro*, na germinação de conídios e crescimento micelial do fungo *C. lindemuthianum*, bem como *in vivo*, na severidade da antracnose e na produção de biomassa aérea em plantas de feijoeiro (*P. vulgaris*). A ulvana, quando adicionada a lâminas escavadas ou ao meio de cultura, elevou a germinação de conídios e o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*, respectivamente. Por outro lado, o extrato solúvel em metanol de *U. fasciata* reduziu significativamente o crescimento micelial do fungo. Nos experimentos *in vivo*, a aplicação de ulvana, na concentração de 10mg/mL, reduziu a severidade da antracnose em cerca de 40%. Os extratos solúveis e insolúveis em metanol da alga *U. fasciata* não reduziram significativamente a severidade da antracnose, entretanto, elevaram em cerca de 20% o peso seco de plantas de feijoeiro (PAULERT *et al.*, 2009).

A pulverização de ulvana, 6 e 3 dias antes da inoculação, reduziu em cerca de 25%, o diâmetro de pústulas de *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger em plantas de feijoeiro (cvs. BR IPA – 11 Brígida, Pérola e IPR Juriti). Não se verificaram diferenças significativas na germinação de uredósporos e formação de apressórios. Plantas de feijoeiro, cv. Pérola, pulverizadas com ulvana apresentaram atividade de glucanases cerca de 190% maior, quando comparadas com plantas testemunhas (BORSATO, 2009).

A ulvana, quando aplicada 6 e 3 dias antes da inoculação, reduziu local e sistemicamente, em cerca de 65%, a severidade da Mancha Foliar de Glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.) em macieira (*Malus domestica* Borkh.), no entanto, quando adicionada ao meio de cultura, não afetou o crescimento do fungo (ARAÚJO *et al.*, 2008).

#### **4.10. Formulações de produtos fitossanitários**

Atualmente, uma grande quantidade de moléculas com atividade biológica diversa vem sendo identificadas ou desenvolvidas (VAN EERDENBRUGH *et al.*, 2009). Entretanto, algumas dessas moléculas apresentam características indesejáveis, tais como uma baixa solubilidade e/ou taxa de dissolução, levando à necessidade do preparo de formulações contendo, além do princípio ativo, agentes molhantes, espalhantes, espalhantes adesivos, dispersantes, supressores de espuma, penetrantes, reguladores da taxa de evaporação, reguladores de pH e protetores solares (MEDUGNO, 2007; VAN EERDENBRUGH *et al.*, 2009).

Alguns fatores devem ser considerados para o preparo de uma formulação, dentre eles pode-se destacar: as características físico-químicas, atividade biológica e modo de ação, método de aplicação, segurança, custos da formulação e preferências de mercado. Após a determinação destes parâmetros, é realizada a seleção do tipo de formulação a ser utilizada. Os principais objetivos do preparo de uma formulação são: otimizar a atividade biológica do ingrediente ativo e fornecer um produto seguro e conveniente para o uso (KNOWLES, 2008).

Os principais tipos de formulações de produtos fitossanitários encontram-se na Tabela 3. As formulações apresentadas diferem entre si pela concentração de ingrediente ativo e demais agentes adicionados em seu preparo.

**Tabela 3.** Principais formulações de produtos fitossanitários encontradas no mercado\*.

Tipo de Formulação	Sigla Internacional
Grânulos	GR
Solução Concentrada	SL
Concentrado Emulsificável	EC
Pó Molhável	WP
Suspensão Concentrada	SC
Emulsões Óleo/Água	EW
Suspensões Emulsionáveis	SE
Micro Emulsões	ME
Grânulos Dispersíveis em Água	WG
Microcápsulas	CS
Tratamentos de Sementes	DS, WS, LS, FS

\*Adaptado de Knowles (2008).

Dentre as formulações apresentadas, pode-se destacar a de Pó Molhável, uma formulação conhecida há muitos anos que pode ser utilizada quando o ingrediente ativo pode ser moído a seco em moinhos mecânicos ou por moagem a ar (KNOWLES, 2008). Um Pó Molhável geralmente é composto por 50 – 95% de ingrediente ativo, 0 – 45% de inerte, 1 – 10% de dispersante e 3 – 5% de molhante (MEDUGNO, 2007; KNOWLES, 2008).

Antes do preparo de um Pó Molhável, além de se verificar os fatores citados anteriormente, deve-se selecionar o melhor inerte para cada ingrediente ativo. Apesar do nome, esses produtos apresentam algum tipo de atividade, podendo alterar o microambiente em torno do

ingrediente ativo (MEDUGNO, 2007). Medugno e colaboradores (1997), estudando o efeito de diferentes inertes na estabilidade física e biológica de formulações de *Baculovirus anticarsia*, verificaram que a atividade do vírus, no controle de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner), foi reduzida pela bentonita, mas não pelos inertes sílica amorfa, atapulgita e caulinita. Apesar do inerte caulinita não afetar o atividade viral, houve uma redução na molhabilidade e formação de aglomerados de partículas.

O extrato da alga marinha *L. digitata* contendo laminarana, um polissacarídeo de reserva de baixo peso molecular extraído de algas marrons e diatomáceas (CHIZHOV *et al.*, 1998; LÉPAGNOL-DESCAMPS *et al.*, 1998), é registrado e comercializado, na forma líquida (40g de laminarana por litro de água) para induzir resistência contra doenças em trigo (*Triticum aestivum* L.), tais como fusariose (*Fusarium graminearum* Schwabe), oídio (*Blumeria graminis* (DC.) Speer) e septoriose (*Septoria nodorum* Berk.) (STADNIK; TALAMINI, 2004)

Dentre os vários inertes passíveis de utilização, pode-se citar a sílica amorfa, a caulinita e a atapulgita. A sílica amorfa é uma sílica sub-microscópica composta por dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>), suas partículas apresentam um tamanho médio de 15nm (HAPGOOD, 2009). Esta sílica possui propriedades adsorventes, antiaglomerantes, estabilizantes de emulsão e de temperatura (HAPGOOD, 2009). Devido ao pequeno tamanho de partícula e grande área superficial específica (200m<sup>2</sup>/g) (HAPGOOD, 2009), a sílica amorfa é muito utilizada em produtos farmacêuticos (TAKEUCHI; HANDA; KAWASHIMA, 1987; WATANABE, *et al.*, 2001, 2002; VAN EERDENBRUGH, *et al.*, 2009), cosméticos, tintas e alimentos (GROTH *et al.*, 1979; JOHNSTON, *et al.*, 2000).

A caulinita ou silicato de alumínio hidratado é uma argila constituída pela seguinte fórmula química: Al<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub> (PALMIERI, 2009). A caulinita é estruturada em forma de duas camadas, uma de tetraedros de óxido de silício e outra de octaedros de óxido de alumínio (WARD, 1984). Essa argila é um agente de suspensão, possui propriedades adsorventes e é utilizada como diluente em comprimidos e cápsulas (PALMIERI, 2009). Devido a suas propriedades e o baixo custo, a caulinita é amplamente utilizada na indústria, e encontra-se presente em cerâmicas, medicamentos, papéis revestidos, alimentos, cremes dentais, lâmpadas incandescentes, cosméticos e tintas (DOGAN; YILMAZ; ALKAN, 2008; KING, 2009), além de apresentar potencial na bioremediação de derramamentos de óleo, favorecendo a atividade das

bactérias envolvidas na degradação de contaminantes (WARR *et al.*, 2009).

A atapulgita ou silicato de alumínio hidratado é uma argila constituída de paligorskita, com a seguinte fórmula química empírica:  $Mg(Al_{0,5-1}Fe_{9-0,5})Si_4O_{10}(OH)\cdot 4H_2O$  (PALMIERI, 2009). A atapulgita é estruturada em forma de cadeia de tetraedros de óxido de silício ligados por octaedros de oxigênio e hidroxilas contendo cátions alumínio e magnésio (WARD, 1984). Essa argila possui propriedades adsorventes, podendo absorver quantidades consideráveis de água e formar géis (PALMIERI, 2009). Devido à suas propriedades adsorventes, a atapulgita vem sendo utilizada na retenção e no retardo da migração de contaminantes (ZHANG; XIE; HO, 2009), tais como: metais tóxicos e poluentes orgânicos e inorgânicos (KISLENKO; VERLINSKAYA, 2001; GONZÁLEZ-PRADA *et al.*, 2005; POTGIETER; POTGIETER-VERMAAK; KALIBANTONGA, 2006; CHEN; WANG, 2007; ZHANG; XIE; HO, 2009), além de apresentar potencial na bioremediação de derramamentos de óleo (WARR *et al.*, 2009).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação e no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – CCA/UFSC.

### 5.1. Condições de cultivo de feijoeiro

Foram semeadas oito sementes de forma equidistante em vaso plástico preto nº3 (Plasticofer Ltda.), com capacidade para dois litros, contendo substrato composto por uma mistura homogênea (v/v) de solo argiloso (75%) e composto orgânico (25%). As sementes foram cobertas com aproximadamente 2,5cm do mesmo substrato. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e irrigados de acordo com as necessidades hídricas da cultura.

No estágio fenológico V2 (folhas primárias de 50% das plantas completamente desenvolvidas) (Tabela 4), foi realizado o desbaste deixando-se três plantas por vaso.

Para a prevenção contra o oídio do feijoeiro (*Erysiphe polygoni* DC), as plantas foram pulverizadas, semanalmente, com uma solução de Enxofre 80% (3g/L, Kumulus® DF, BASF).

**Tabela 4.** Caracterização e evolução dos estádios fenológicos para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivado em condições de casa-de-vegetação\*.

Estádio	Dias	Características
V0	3	Germinação iniciada em 50% das sementes.
V1	5	Cotilédones de 50% das plantas completamente desenvolvidos.
V2	9	Folhas primárias de 50% das plantas completamente desenvolvidas.
V3	13	Primeiro trifólio de 50% das plantas completamente desenvolvido.
V4	23	Terceiro trifólio de 50% das plantas completamente desenvolvido.

\*Adaptado de Dourado Neto e Fancelli (2000).

### 5.2. Obtenção e aplicação da ulvana

A macroalga marinha *U. fasciata* foi coletada nos costões rochosos da Praia da Armação no litoral de Florianópolis, SC, em janeiro de 2007. A coleta da alga foi registrada no Laboratório de Fitopatologia – LABFITOP do CCA com o número 67. A exsiccata da alga encontra-se

depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná sob o código UPCB 61313.

O material coletado foi submetido a uma limpeza manual, para a eliminação de contaminantes. Em seguida, o material selecionado foi lavado com água corrente de torneira, a alga foi pesada e imediatamente colocada em estufa com aeração a 40°C, por 48h. A macroalga seca foi triturada obtendo-se um pó fino, o qual foi pesado e armazenado a 5°C até o momento da extração do polissacarídeo.

A ulvana foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Cluzet *et al.* (2004) e Paulert *et al.* (2009), autoclavando-se 30g do pó seco da macroalga marinha *U. fasciata* em 300mL de água destilada, durante 2h a 110°C. A solução aquosa obtida foi filtrada com auxílio de um pano e em seguida, a ulvana foi precipitada a -20°C por 48h, adicionando-se três volumes de etanol 96GL. Após a precipitação, o polissacarídeo foi coletado, seco em estufa a 45°C por 48h, e armazenado a 5°C até a utilização nos ensaios.

As plantas foram pulverizadas com ulvana (10mg/mL), quando apresentaram o segundo trifólio completamente expandido. O tratamento foi realizado duas vezes, isto é, aos 6 e 3 dias antes da inoculação (DAI). Plantas pulverizadas com água destilada foram utilizadas como testemunhas.

As soluções foram pulverizadas com o auxílio de pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58psi, bico 0,7mm de diâmetro, marca Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (marca Schulz, Brasil; pressão de 25lbf/pol<sup>2</sup>; potência de 180W; vazão de 105mL/min.).

### **5.3. Origem, manutenção e produção do inóculo**

Para a realização dos experimentos foi utilizado o isolado monospórico MANE (Micoteca Anne-Lore Schroeder – CCA - UFSC) 001-03 da raça 73 de *C. lindemuthianum* originado da região do Alto Vale do Itajaí, SC, e previamente caracterizado por Loffaguen *et al.* (2005).

O inóculo foi produzido segundo metodologia descrita por Talamini *et al.* (2004). Para tanto, vagens verdes de feijoeiro foram parcialmente imersas em meio ágar-água (12g/L; 5mL/tubo) no interior de tubos de ensaio e esterilizadas por duas vezes em autoclave a 110°C por 1h, com intervalo de 24 horas entre as autoclavagens. Em condições assépticas em câmara de fluxo, com o auxílio de um vazador, discos de 8mm contendo micélio do fungo em meio BDA foram transferidos para

as vagens previamente esterilizadas. O material foi então incubado à  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  e 12h de fotoperíodo.

Vinte dias após a incubação, adicionaram-se 10mL de água destilada no interior dos tubos e procedeu-se a agitação leve para desprender os conídios. Em seguida, a suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e homogeneizada em agitador. Por fim, a concentração de conídios foi determinada com auxílio de câmara de Neubauer, e ajustada para a concentração de  $3 \times 10^6$  conídios/mL.

#### **5.4. Inoculação das plantas com *C. lindemuthianum***

As plantas foram inoculadas com a suspensão de conídios quando apresentaram o terceiro trifólio completamente expandido (estádio V4), com auxílio de pistola de pintura acoplada a um compressor de ar.

Após a inoculação, as plantas foram incubadas em câmara úmida por 48h, mantendo-se assim, as condições necessárias para o desenvolvimento do processo infeccioso do fungo. Em seguida, as plantas foram transferidas para bancadas em casa-de-vegetação. Plantas que não foram inoculadas com o fungo permaneceram nas bancadas em casa-de-vegetação.

#### **5.5. Avaliação da severidade da antracnose**

A severidade da antracnose foi avaliada a cada 2 dias a partir do aparecimento dos primeiros sintomas utilizando-se a escala de notas de Rava *et al.* (1993) (Tabela 5). A partir dos dados de severidade, foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), utilizando-se a seguinte fórmula:  $\text{AACPD} = [((y_1 + y_2)/2) * (t_2 - t_1)]$ , onde  $y_1$  e  $y_2$  são duas avaliações consecutivas de severidade realizadas nos tempos  $t_1$  e  $t_2$ , respectivamente.

**Tabela 5.** Escala descritiva da severidade da antracnose do feijoeiro \*.

<b>Notas</b>	<b>Descrição dos sintomas</b>
1	Ausência de sintomas.
2	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior das folhas.
3	Maior frequência dos sintomas descritos no grau 2, até 3% das nervuras afetadas.
4	Até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha.
5	Maior frequência dos sintomas descritos no grau 4, até 3% das nervuras afetadas.
6	Manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces da folha, presença de algumas lesões em talos, galhos e pecíolos.
7	Manchas necróticas na maioria das nervuras e em grande parte do tecido do mesófilo adjacente que se rompe. Lesões abundantes em talos, ramos e pecíolos.
8	Manchas necróticas em quase todas as nervuras, ocasionando ruptura, desfolhamento e redução do crescimento da planta. Lesões muito abundantes em talos, ramos e pecíolos.
9	Majoria das plantas mortas.

\* Rava *et al.* (1993).

### **5.6. Mecanismos bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose**

Para a realização desse experimento foram utilizadas uma linhagem resistente à antracnose selecionada de uma população segregante da cultivar comercial de feijoeiro IPR Uirapuru e a cultivar suscetível à antracnose IPR Uirapuru (IAPAR, 2008). As plantas foram cultivadas conforme o item 5.1, sob temperatura média de  $30 \pm 6^\circ\text{C}$ .

As plantas foram pulverizadas com ulvana (5mL/planta; 10mg/mL), conforme o item 5.2, quando apresentaram o segundo trifólio completamente expandido. Durante os tratamentos, o terceiro trifólio de cada planta foi coberto para a avaliação do efeito sistêmico.

Após o tratamento, as plantas foram inoculadas, conforme o item 5.4, com aproximadamente 5mL de inóculo por planta e incubadas a  $27^\circ\text{C}$  e 90% de umidade relativa do ar. Em seguida, foi realizada a avaliação da severidade conforme item 5.5.

O monitoramento da atividade de peroxidases e  $\beta$ -1,3-glucanases, a avaliação do processo infeccioso e a detecção da reação de hipersensibilidade foram realizados às 12, 24 e 48h após a inoculação. Para tanto, foram retirados ao acaso quatro vasos (repetições) de cada tratamento, dos quais foram coletados os folíolos laterais direito e esquerdo do primeiro trifólio de cada planta para a análise da atividade de peroxidases e  $\beta$ -1,3-glucanases, respectivamente. Após a coleta, o material foi pesado, acondicionado em papel alumínio, armazenado em gelo, e em seguida, armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. Do folíolo central de cada planta foram coletados, com o auxílio de um furador de rolhas, quatro discos foliares (8mm) para a avaliação do processo infeccioso e detecção da reação de hipersensibilidade.

### **5.6.1. Monitoramento da atividade de peroxidases**

Para a análise da atividade de peroxidases foi utilizada a metodologia descrita por Cipollini (1998), com algumas modificações. As folhas foram maceradas em cadinho de porcelana (100mL, Nalgon, Brasil), na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) na proporção de 5:1 (v/p). A suspensão foi transferida para microtubos de 2mL (Axygen, EUA) e centrifugada (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha) a 11.600xg por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante coletado e armazenado em gelo até o momento da análise.

A atividade de peroxidases foi determinada em espectrofotômetro (modelo 700Plus, Femto, Brasil) em 2,9mL de tampão fosfato de sódio (10mM, pH 6,0) contendo 0,25% de guaiacol (v/v) (Sigma, EUA) e 0,125% de peróxido de hidrogênio (v/v) (Merck, Alemanha). Após a adição de 0,1mL de extrato vegetal, foram acompanhadas as variações na absorbância a 470nm por 3 minutos, com anotações a cada 30 segundos. A atividade da enzima foi medida conforme o aumento da Densidade Óptica (DO)/min/mg de proteína.

### **5.6.2. Monitoramento da atividade de $\beta$ -1,3-glucanases**

A análise da atividade de  $\beta$ -1,3-glucanases foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Wirth e Wolf (1992), com algumas modificações. Para tanto, as folhas foram maceradas em cadinho de porcelana (100mL, Nalgon, Brasil), na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado tampão acetato de sódio (80mM, pH 5,0) na proporção de 4:1 (v/p), contendo 1mM de EDTA. A suspensão foi transferida para microtubos de 2mL

(Axygen, EUA) e centrifugada (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha) a 10.000xg por 15 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C até o momento da análise.

Para a determinação da atividade de glucanases foi utilizado como substrato uma solução de carboximetilcurdilan-remazol brilhante azul (CM-curdlan-RBB 4mg/mL, Loewe Biochemica, Alemanha). Para tanto, foram adicionados em tubos com capacidade para 2mL (Axygen, EUA): 200µL de extrato vegetal, 400µL de tampão de extração (acetato de sódio 80mM, pH 5,0) e 200µL de CM-curdlan-RBB (4mg/mL), tubos contendo somente tampão de extração e CM-curdlan-RBB foram utilizados como “branco”. Em seguida, os tubos foram incubados, em banho-maria, por 2h a 40°C. A reação foi interrompida com a adição de 200µL de HCl 2N, e os tubos foram resfriados por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000xg por 15 minutos. A absorbância a 600nm do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro (modelo 700Plus, Femto, Brasil). A atividade de β-1,3-glucanases foi expressa em absorbância a 600nm/mg de proteína.

### **5.6.3. Quantificação do conteúdo de proteínas**

A quantificação do conteúdo de proteínas totais nas amostras foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976). A reação foi realizada em tubos com capacidade para 2mL (Axygen, EUA), contendo 962µL de reagente de Bradford (0,01% (p/v) de Azul Brilhante de Coomassie; 4,7% (v/v) de etanol 95% e 8,5% (v/v) de ácido fosfórico 85%) e 38µL de amostra. Após a reação à temperatura ambiente por 5 minutos, a absorbância a 595nm foi determinada em espectrofotômetro (modelo 700Plus, Femto, Brasil). A curva padrão de proteínas foi determinada utilizando-se como padrão concentrações de albumina de soro bovino (Sigma, EUA) variando de 0 a 19µg/mL (Anexos 5 e 6).

### **5.6.4. Avaliação do processo infeccioso**

Os discos foliares coletados foram processados para a realização de análise microscópica, conforme metodologia descrita por Stadnik e Buchenauer (2000). Após a coleta, discos foliares foram imediatamente depositados em placas de petri (5cm de diâmetro) contendo papel filtro e 5mL de uma solução de etanol e ácido acético (3:1, v/v), para a fixação e clareamento dos tecidos da planta. A solução foi trocada periodicamente durante 3 dias, para o devido clareamento do material.

Em seguida, a solução de clareamento foi substituída por uma solução de conservação (ácido láctico: glicerol: água, 1:1:1, v/v/v).

Para a visualização das estruturas do fungo, foi utilizada uma solução de azul de Aman (ácido láctico, 10mL; glicerina, 10mL, ácido fênico cristalizado, 10g; azul de algodão, 0,1g e água destilada, 10mL). Após permanecerem por 10 minutos na solução de azul de Aman, os discos foram montados em lâminas de vidro e visualizados em microscópio óptico (modelo FWL1500T, Feldmann Wild Leitz, Brasil) no aumento de 400x.

A porcentagem de germinação de conídios e formação de apressórios foram determinadas em 100 conídios sobre os discos foliares. Os conídios e as estruturas de infecção do fungo foram fotografados com o auxílio de uma câmera digital (modelo DSC-W300, Sony, Japão).

### **5.6.5. Detecção da reação de hipersensibilidade**

A avaliação do número de células apresentando reação de hipersensibilidade (RH) foi realizada conforme metodologia descrita por Hüchelhoven *et al.* (1999), com algumas modificações. Para tanto, os discos foliares foram imediatamente depositados em placas de petri (5cm de diâmetro) contendo papel filtro e 5mL de uma solução de 1mg/mL de diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA), onde permaneceram por 12h, para a formação de polímeros de DAB na presença de peroxidases e peróxido de hidrogênio. Em seguida, a solução de diaminobenzidina foi substituída por uma solução de clareamento (ácido tricloroacético 0,15%, p/v em álcool etílico: clorofórmio, 4:1, v/v), por 24h. Findo este período, os discos foram transferidos para uma solução de conservação (ácido láctico: glicerol: água, 1:1:1, v/v/v).

Células hipersensitivas apresentavam coloração marrom-avermelhada. O número de células apresentando reação de hipersensibilidade (RH) foi avaliado em toda a superfície dos discos foliares e em seguida, foi transformado para número de células com RH/cm<sup>2</sup>. Células apresentando reação de hipersensibilidade foram fotografadas com o auxílio de uma câmera digital (modelo DSC-W300, Sony, Japão).

## **5.7. Influência de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana**

Para a avaliação do efeito de diferentes inertes sobre a armazenabilidade e eficiência da ulvana no controle da antracnose do feijoeiro, foram realizados quatro experimentos idênticos em intervalo de 4 meses, durante o período de 1 ano.

### **5.7.1. Preparo dos tratamentos**

A ulvana foi obtida conforme descrito anteriormente no item 5.2, armazenada a 5°C e, no mês de outubro de 2007 foi enviada, em forma de placas de polissacarídeo, para a pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna/SP) Claudia Conti Medugno para o preparo dos tratamentos.

Os produtos foram moídos em uma proporção de 1:1 (inerte: ulvana) em moinho até a obtenção de um pó fino. A limpeza do moinho, entre as moagens, foi realizada com a adição do próximo inerte a ser utilizado. Após a moagem, os produtos foram armazenados em recipientes plásticos a  $24 \pm 5^\circ\text{C}$  e 60% de umidade relativa do ar.

Para o preparo dos tratamentos foram utilizados os seguintes inertes: sílica amorfa (Aerosil 200<sup>®</sup>, Degussa/Evonik), composta basicamente por dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) (AEROSIL, 2009), caulinita (Caulim Monte Pascoal<sup>®</sup>, Monte Pascoal), composta por óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) (MONTE PASCOAL, 2009) e atapulgita (Attagel 50 Engelhard<sup>®</sup>, BASF), constituída por óxido de magnésio ( $\text{MgO}$ ), óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) (BASF, 2009).

As formulações de ulvana com a caulinita, a sílica amorfa e a atapulgita apresentaram pH de 7,6, 7,3 e 7,1, respectivamente, enquanto que o pH obtido para a ulvana foi de 6,8.

### **5.7.2. Avaliação dos tratamentos**

A avaliação do efeito dos diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana foi iniciada após o preparo dos tratamentos (Tempo 0 = 3 dias após o preparo dos tratamentos; agosto de 2008) e, as demais avaliações foram realizadas nos Tempos 1 (dezembro de 2008), 2 (abril de 2009) e 3 (agosto de 2009).

Plantas de *P. vulgaris* cv. Uirapuru foram cultivadas conforme item 5.1 sob temperaturas de  $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $30 \pm 6^\circ\text{C}$ ,  $18 \pm 6^\circ\text{C}$  e  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ , para os tempos 0, 1, 2 e 3, respectivamente.

As plantas foram pulverizadas (3mL/planta) com os três tratamentos (concentração de ulvana: 10mg/mL), ulvana e água (testemunha) conforme o item 5.2.

As plantas previamente tratadas foram inoculadas conforme o item 5.4, com aproximadamente 3mL de inóculo por planta e incubadas a 25°C e 90% de umidade relativa do ar. Em seguida, foi realizada a avaliação da severidade conforme item 5.5.

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

O experimento mecanismos de defesa bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose foi conduzido em delineamento fatorial com 3 fatores completamente casualizado: linhagem (resistente ou suscetível), tratamento (água ou ulvana) e inoculação (plantas inoculadas ou não inoculadas) (Tabela 6). Foram utilizadas 12 repetições, onde cada repetição foi constituída de um vaso com três plantas.

**Tabela 6.** Esquema dos tratamentos utilizados no estudo dos mecanismos de defesa bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose.

<b>Representação</b>	<b>Tratamento</b>
T1	Resistente + Água + Inoculada
T2	Resistente + Ulvana + Inoculada
T3	Resistente + Água + Não Inoculada
T4	Resistente + Ulvana + Não Inoculada
T5	Suscetível + Água + Inoculada
T6	Suscetível + Ulvana + Inoculada
T7	Suscetível + Água + Não Inoculada
T8	Suscetível + Ulvana + Não Inoculada

Para a avaliação do efeito de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana, foi utilizado o delineamento experimental completamente casualizado, com cinco repetições. Cada repetição foi constituída de um vaso com três plantas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Esquema dos tratamentos utilizados no estudo do efeito de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana no controle da antracnose do feijoeiro.

<b>Representação</b>	<b>Tratamento</b>
T1	Ulvana + Sílica Amorfa
T2	Ulvana + Caulinita
T3	Ulvana + Atapulgita
T4	Ulvana (Testemunha)
T5	Água (Testemunha)

Inicialmente, foi verificada a homogeneidade das variâncias de cada um dos conjuntos de dados. Em seguida, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para a separação de médias, foi utilizado o Teste de Tukey a 5% de significância. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Statistica 6.0<sup>®</sup> (StatSoft).

## **6. RESULTADOS**

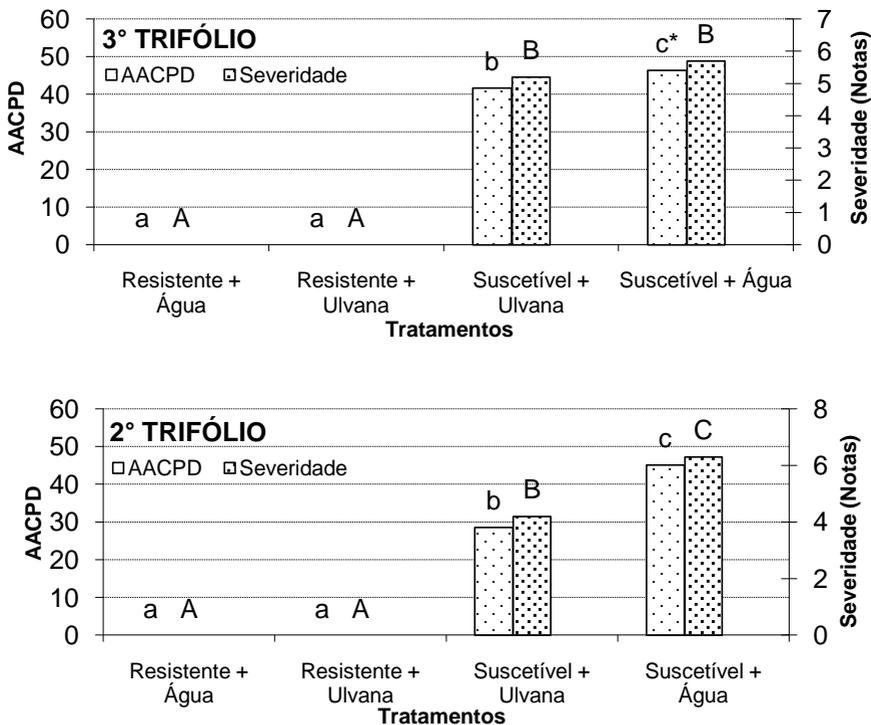
### **6.1. Mecanismos bioquímicos e histológicos envolvidos na resistência do feijoeiro à antracnose**

#### **6.1.1. Severidade da antracnose**

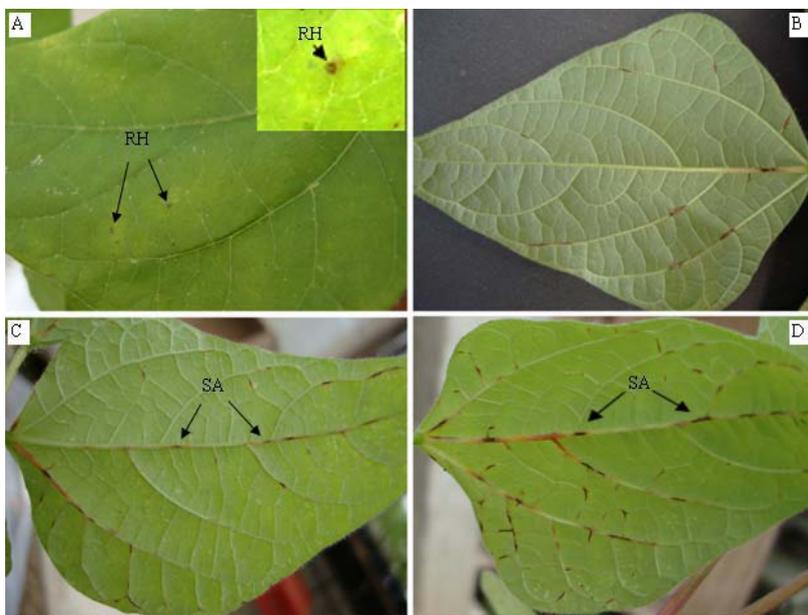
Os primeiros sintomas da antracnose apareceram 5 dias após a inoculação com *C. lindemuthianum* (*Cl*). A severidade da antracnose no segundo trifólio (efeito local) de plantas suscetíveis à raça 73 de *Cl* pulverizadas com água (testemunhas), 11 dias após a inoculação, atingiu nota 6 (Figura 2 e 3D). Além de apresentarem lesões necróticas em ambas as faces da folha, estas plantas apresentavam algumas lesões nos ramos e pecíolos (Figura 3D). A pulverização de ulvana reduziu a severidade da antracnose aos 11 DPI em cerca de 30%, no segundo trifólio, que apresentava algumas poucas lesões necróticas perceptíveis em ambas as faces da folha (Figura 3B). A AACPD calculada para o segundo trifólio de plantas suscetíveis testemunhas foi de 40,8. A pulverização de ulvana reduziu em cerca de 30% a AACPD (28,7) (Figura 2).

No terceiro trifólio (efeito sistêmico), a severidade da antracnose em plantas suscetíveis testemunhas, 11 dias após a inoculação, atingiu nota 6 (Figura 3D). A pulverização de ulvana não reduziu significativamente a severidade da antracnose aos 11 DPI, que atingiu nota 5 (Figura 3C). Em média, essas plantas apresentavam lesões necróticas visíveis em ambas as faces das folhas atingindo aproximadamente 3% das nervuras. A AACPD calculada para o terceiro trifólio de plantas suscetíveis testemunhas foi de 46,4. A pulverização de ulvana reduziu em cerca de 10% a AACPD.

Plantas resistentes tratadas com ulvana ou água destilada não apresentaram sintomas da antracnose, confirmando a resistência à raça 73 de *Cl*. Entretanto, 4 dias após a inoculação, foi observado o aparecimento de pequenos pontos necróticos, caracterizando a reação de hipersensibilidade (Figura 3A).



**Figura 2.** Severidade da antracnose aos 11 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) avaliadas no segundo trifólio (efeito local) e terceiro trifólio (efeito sistêmico) de plantas resistentes e suscetíveis de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, pulverizadas ou não com ulvana. Letras minúsculas para a AACPD e maiúsculas para a severidade indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. \*Diferença significativa ao nível de 7%.



**Figura 3.** Reação de hipersensibilidade, 4 DPI (A) e sintomas da antracnose em nervuras das faces abaxial representando as notas 4, 5 e 6 (RAVA *et al.*, 1993) (B, C e D, respectivamente), em plantas de feijoeiro cv. IPR Uirapuru, 9 dias após a inoculação com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*. RH: reação de hipersensibilidade; SA: sintomas da antracnose.

### 6.1.2. Peroxidases

A atividade de peroxidases às 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de plantas de feijoeiro resistentes e suscetíveis à antracnose tratadas com ulvana (10mg/mL) ou água destilada (testemunha), é encontrada na Tabela 8.

A atividade de peroxidases foi sempre maior em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis, independente de serem inoculadas ou não. A maior diferença entre as linhagens foi obtida às 48 HAI, onde plantas resistentes apresentaram atividades cerca de 70% e 50% maiores do que as plantas suscetíveis, inoculadas ou não, respectivamente.

A inoculação de plantas resistentes com a raça 73 de *Cl* elevou a atividade de peroxidases, 48 HAI, em cerca de 50%.

A atividade de peroxidases, de uma maneira geral, foi maior em plantas tratadas com ulvana e não inoculadas. Entretanto, em plantas inoculadas, o efeito da ulvana foi significativo somente às 48 HAI.

A atividade de peroxidases foi maior em plantas resistentes pulverizadas com ulvana e não inoculadas. Por outro lado, em plantas resistentes inoculadas, o efeito da ulvana foi significativo somente às 48 HAI. A pulverização de ulvana não afetou significativamente a atividade enzimática de plantas suscetíveis inoculadas ou não.

**Tabela 8.** Atividade de peroxidases, avaliada no primeiro trifólio, em linhagem resistente (R) e suscetível (S) de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), em plantas inoculadas ou não com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

		Atividade de Peroxidases (DO/min./mg de Proteína*)					
HAI	Linha	Inoculadas			Não Inoculadas		
		H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$	H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$
12	R	14,0	18,8 <sup>ns</sup>	16,4 A	13,2 a	20,3 b	16,8 A
	S	12,7	12,5 <sup>ns</sup>	12,6 B	12,1	14,4 <sup>ns</sup>	13,3 B
	$\bar{x}$	13,4	15,7 <sup>ns</sup>		12,7 a	17,4 b	
24	R	14,8	16,1 <sup>ns</sup>	15,5 A	12,2 a	19,9 b	16,1 A
	S	11,0	13,3 <sup>ns</sup>	12,2 B	11,4	13,4 <sup>ns</sup>	12,4 B
	$\bar{x}$	12,9	14,7 <sup>ns</sup>		11,8 a	16,7 b	
48	R	19,4 a	26,2 b	22,8 A	11,7 a	18,1 b	14,9 A
	S	11,8	14,3 <sup>ns</sup>	13,1 B	7,9	11,7 <sup>ns</sup>	9,8 B
	$\bar{x}$	15,6 a	20,3 b		9,8 a	14,9 b	

\*Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. <sup>ns</sup>: não significativo na linha;  $\bar{x}$ : média. Dms para comparações entre plantas inoculadas ou não: 12 HAI: 4,6; 24 HAI: 4,6 e 48 HAI: 5,1.

### 6.1.3. Glucanases

A atividade de glucanases às 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de plantas de feijoeiro resistentes e suscetíveis à antracnose tratadas com ulvana (10mg/mL) ou água destilada (testemunha), é encontrada na Tabela 9.

A atividade de glucanases foi semelhante entre plantas resistentes e suscetíveis, inoculadas ou não.

A pulverização de ulvana elevou a atividade de glucanases, independente das plantas serem inoculadas ou não. As maiores diferenças entre os tratamentos foram obtidas às 24 HAI em plantas inoculadas, onde a ulvana elevou em cerca de 40% a atividade e às 24 e 48 HAI em plantas não inoculadas, onde o tratamento com o polissacarídeo elevou em cerca de 70% a atividade de glucanases.

A atividade de glucanases foi sempre maior em plantas resistentes pulverizadas com ulvana, inoculadas ou não. Por outro lado, em plantas suscetíveis, a ulvana elevou a atividade de glucanases às 12 e 24 HAI, em plantas inoculadas e às 24 e 48 HAI, em plantas não inoculadas.

**Tabela 9.** Atividade de glucanases, avaliada no primeiro trifólio, em linhagem resistente (R) e suscetível (S) de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), em plantas inoculadas ou não com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

		Atividade de Glucanases (Abs. 600nm/mg Proteína)*					
HAI	Linha	Inoculadas			Não Inoculadas		
		H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$	H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$
12	R	12,8 a	16,0 b	14,4	10,9 a	14,1 b	12,5
	S	12,4 a	15,5 b	14,0 <sup>NS</sup>	13,1	15,1 <sup>ns</sup>	14,1 <sup>NS</sup>
	$\bar{x}$	12,6 a	15,6 b		12,0 a	14,6 b	
24	R	13,3 a	20,0 b	16,7	9,9 a	15,9 b	12,9
	S	15,4 a	20,9 b	18,2 <sup>NS</sup>	7,9 a	14,3 b	11,1 <sup>NS</sup>
	$\bar{x}$	14,4 a	20,5 b		8,9 a	15,1 b	
48	R	13,4 a	17,4 b	15,4	10,3 a	14,7 b	12,5 A
	S	14,1	15,1 <sup>ns</sup>	14,6 <sup>NS</sup>	6,3 a	13,3 b	9,8 B
	$\bar{x}$	13,8 a	16,2 b		8,3 a	14,0 b	

\*Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. <sup>ns</sup>: não significativo na linha; <sup>NS</sup>: não significativo na coluna;  $\bar{x}$ : média. Dms para comparações entre plantas inoculadas ou não: 12 HAI: 3,3; 24 HAI: 7,0 e 48 HAI: 4,8.

#### 6.1.4. Germinação de conídios e formação de apressórios de *C. lindemuthianum*

A germinação de conídios e formação de apressórios de *C. lindemuthianum* às 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de plantas de feijoeiro resistentes e suscetíveis à antracnose tratadas com ulvana (10mg/mL) ou água destilada (testemunha), são encontradas na Tabela 10 e nas Figuras 4A e B.

Não houve diferenças significativas na germinação de conídios e formação de apressórios da raça 73 de *Cl* em plantas resistentes e suscetíveis, exceto às 12 e 24 HAI, para a formação de apressórios e germinação de conídios, respectivamente.

A germinação de conídios e formação de apressórios do fungo foi menor, às 12 HAI, sobre o primeiro trifólio de plantas resistentes e suscetíveis previamente tratadas com ulvana.

A formação de apressórios de *Cl* foi menor às 12 e 48 HAI em plantas resistentes pulverizadas com ulvana. Enquanto que, em plantas suscetíveis tratadas com o polissacarídeo, a germinação de conídios e a formação de apressórios foram menores às 12 HAI.

**Tabela 10.** Porcentagem de germinação de conídios e formação de apressórios, em relação ao número de conídios germinados, da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* sobre a superfície foliar de linhagem resistente (R) e suscetível (S) de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, pulverizadas ou não com ulvana, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI).

HAI	Linha	Germinação de Conídios (%)			Formação de Apressórios (%)		
		H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$	H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$
12	R	40,9	38,4 <sup>ns</sup>	39,7	14,9 a	7,0 b	11,0 A
	S	40,9 a	35,3 b	38,1 <sup>NS</sup>	12,2 a	2,4 b	7,3 B
	$\bar{x}$	40,9 a	36,9 b		13,6 a	4,7 b	
24	R	76,5	78,3 <sup>ns</sup>	77,4 A	5,5	4,9 <sup>ns</sup>	5,2
	S	81,1	83,4 <sup>ns</sup>	82,3 B	6,1	4,1 <sup>ns</sup>	5,1 <sup>NS</sup>
	$\bar{x}$	78,8	80,9 <sup>ns</sup>		5,8	4,5 <sup>ns</sup>	
48	R	90,1	90,4 <sup>ns</sup>	90,3	8,8 a	5,7 b	7,3
	S	90,8	90,5 <sup>ns</sup>	90,7 <sup>NS</sup>	6,7	8,3 <sup>ns</sup>	7,5 <sup>NS</sup>
	$\bar{x}$	90,5	90,5 <sup>ns</sup>		7,8	7,0 <sup>ns</sup>	

\*Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. <sup>ns</sup>: não significativo na linha; <sup>NS</sup>: não significativo na coluna;  $\bar{x}$ : média.

### 6.1.5. Reação de hipersensibilidade

O número de células apresentando reação de hipersensibilidade/cm<sup>2</sup> às 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de plantas de feijoeiro resistentes e suscetíveis à antracnose tratadas com ulvana (10mg/mL) ou água destilada (testemunha), é encontrada na Tabela 11 e nas Figuras 4C e D.

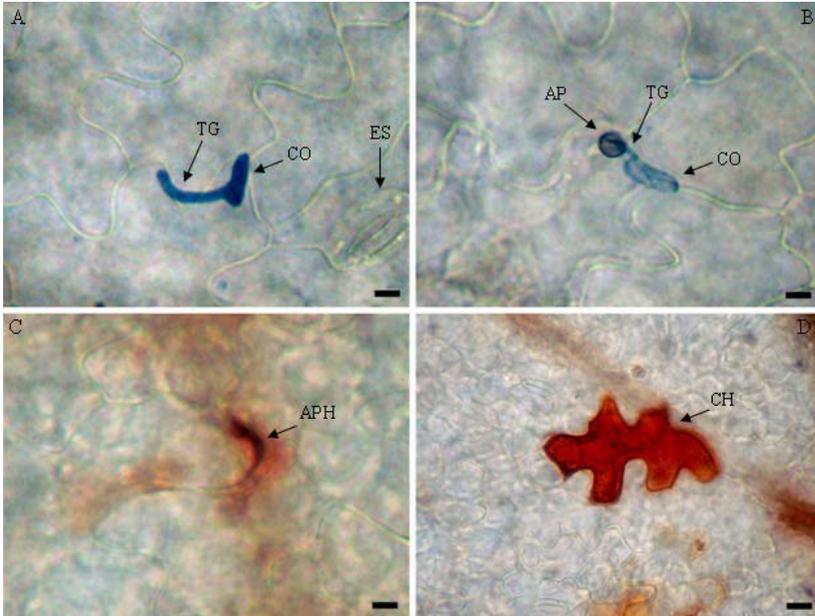
O número de células apresentando reação de hipersensibilidade/cm<sup>2</sup> (RH/cm<sup>2</sup>) foi maior na linhagem resistente às 24 e 48 HAI, diferindo da testemunha. Às 24 HAI, plantas resistentes apresentavam o dobro de células hipersensitivas que as suscetíveis.

A pulverização de ulvana não afetou o número de células hipersensitivas, exceto às 24 HAI, quando plantas resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana apresentaram menor quantidade de células com RH.

**Tabela 11.** Número de células com reação de hipersensibilidade/cm<sup>2</sup> na superfície foliar de linhagem resistente (R) e suscetível (S) de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru, pulverizadas ou não com ulvana, 12, 24 e 48 horas após a inoculação com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

HAI	Linha	Células com Reação de Hipersensibilidade/cm <sup>2</sup>		
		H <sub>2</sub> O	Ulvana	$\bar{x}$ *
12	R	15	15 <sup>ns</sup>	15
	S	22	18 <sup>ns</sup>	20 <sup>NS</sup>
	$\bar{x}$	19	17 <sup>ns</sup>	
24	R	33 a	25 b	29 A
	S	19 a	9 b	14 B
	$\bar{x}$	26 a	17 b	
48	R	44	37 <sup>ns</sup>	41 A
	S	23	21 <sup>ns</sup>	22 B
	$\bar{x}$	34	29 <sup>ns</sup>	

\*Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey. <sup>ns</sup>: não significativo na linha; <sup>NS</sup>: não significativo na coluna;  $\bar{x}$  : média.



**Figura 4.** Germinação de conídios da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum* (A e B), acúmulo de peróxido de hidrogênio e reação de hipersensibilidade em plantas de *Phaseolus vulgaris* (C e D), detectada utilizando a diaminobenzidina (DAB), 24 horas após a inoculação. TG: tubo germinativo; CO: conídio; ES: estômato; AP: apressório; APH: acúmulo de peróxido de hidrogênio na parede celular; CH: célula epidérmica apresentando reação de hipersensibilidade. Barras = 10μm.

## 6.2. Influência de diferentes inertes na armazenabilidade e eficiência da ulvana

No momento do preparo dos tratamentos (agosto de 2008), a severidade da antracnose, avaliada 13 dias após a inoculação no primeiro e segundo trifólios de plantas testemunhas, atingiu nota 5 (Figura 5). Estas plantas apresentavam lesões necróticas visíveis em ambas as faces da folha atingindo até 3% das nervuras. A pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a severidade aos 13 DPI em 60, 48 e 60%, respectivamente. A AACPD em plantas testemunhas foi de 30,9 enquanto que, a pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a AACPD em

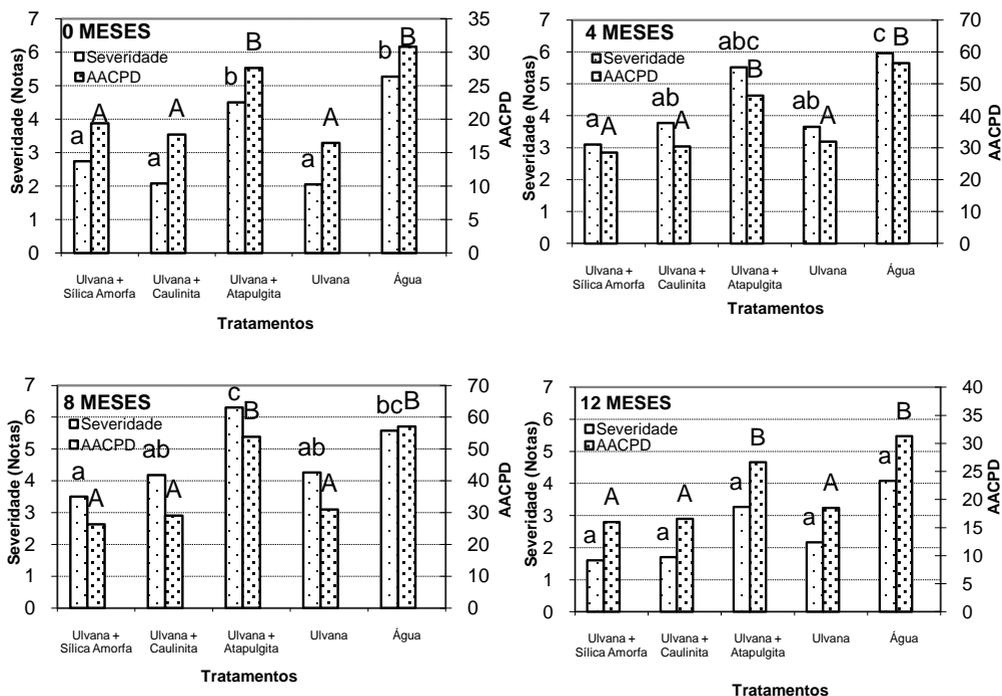
46, 37 e 42%, respectivamente. A pulverização da formulação de ulvana com a atapulgita não reduziu significativamente a severidade aos 13 DPI e a AACPD, no momento do preparo dos tratamentos, quando comparado com a testemunha (Figura 5).

Quatro meses após o preparo dos tratamentos (dezembro de 2008), a severidade da antracnose, avaliada 13 dias após a inoculação em plantas testemunhas atingiu nota 6. Essas plantas apresentavam lesões necróticas visíveis em ambas as faces da folha e algumas lesões em galhos e pecíolos. A pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a severidade aos 13 DPI em 39, 48 e 37%, respectivamente. A AACPD em plantas testemunhas foi de 56,5 enquanto que, a pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a AACPD em 43, 50 e 46%, respectivamente. A pulverização da formulação de ulvana com a atapulgita não reduziu significativamente a severidade aos 13 DPI e a AACPD, quatro meses após o preparo dos tratamentos, quando comparado com a testemunha.

Oito meses após o preparo dos tratamentos (abril de 2009), a severidade da antracnose, avaliada 13 dias após a inoculação em plantas testemunhas atingiu nota 6. A pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a severidade aos 13 DPI em 28, 42 e 30%, respectivamente. A AACPD em plantas testemunhas foi de 57,1 enquanto que, a pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a AACPD em 46, 54 e 49%, respectivamente. A pulverização da formulação de ulvana com a atapulgita não reduziu significativamente a severidade aos 13 DPI e a AACPD, oito meses após o preparo dos tratamentos, quando comparado com a testemunha.

Doze meses após o preparo dos tratamentos (agosto de 2009), a severidade da antracnose, avaliada 13 dias após a inoculação em plantas testemunhas atingiu nota 4. Estas plantas apresentavam lesões necróticas visíveis em ambas as faces da folha atingindo até 1% das nervuras. A pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a severidade aos 13 DPI em 46, 61 e 59%, respectivamente, não diferindo da testemunha. A AACPD em plantas testemunhas foi de 31,3 enquanto que, a pulverização de ulvana ou das formulações do polissacarídeo com a sílica amorfa ou caulinita, reduziu a AACPD em 41, 49 e 47%, respectivamente. A pulverização da formulação de ulvana com a

atapulgita não reduziu significativamente a severidade aos 13 DPI e a AACPD, doze meses após o preparo dos tratamentos.



**Figura 5.** Severidade da antracnose aos 13 DPI e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) avaliadas no primeiro e segundo trifólios de plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru pulverizadas com ulvana (10mg/mL) e as combinações de ulvana com os inertes caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL), avaliadas aos 0, 4, 8 e 12 meses após o preparo dos tratamentos. Letras minúsculas para a severidade e maiúsculas para a AACPD indicam diferença significativa ao nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

## 7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a pulverização de ulvana (10mg/mL) promoveu uma redução de cerca de 30% tanto na severidade da antracnose aos 11 DPI quanto na AACPD (Figura 2), no segundo trifólio (efeito local) de plantas de *P. vulgaris* cv. IPR Uirapuru. Resultados semelhantes foram obtidos por PAULERT *et al.* (2009), que relataram uma redução de 38% na severidade da antracnose em plantas de *P. vulgaris* previamente tratadas com ulvana. A aplicação deste polissacarídeo tem demonstrado também potencial para o controle de outras doenças, tais como, a ferrugem (*U. appendiculatus*) do feijoeiro (BORSATO, 2009) e a mancha foliar de *Glomerella* (*C. gloeosporioides*) em macieira (*M. domestica*) (ARAUJO *et al.*, 2008). Considerando que a ulvana não possui efeito antifúngico e que pode elicitar respostas de defesa tanto local quanto sistemicamente em plantas (ARAUJO *et al.*, 2008; CLUZET *et al.*, 2004; PAULERT *et al.*, 2009; STADNIK *et al.*, 2009), é provável que a redução de doença tenha sido causada por mecanismos de defesa induzidos pelo polissacarídeo. Geralmente, a expressão da resistência induzida leva a uma redução no tamanho e/ou número de lesões causadas no hospedeiro pelo patógeno, levando assim, a um atraso no desenvolvimento da doença. Seus princípios podem ser aplicados na proteção de plantas contra um amplo espectro de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus (HAMMERSCHMIDT, 1999; STADNIK e MARASCHIN, 2004; HAMMERSCHMIDT, 2007).

A pulverização de ulvana reduziu a AACPD, mas não afetou a severidade aos 11 DPI da antracnose no terceiro trifólio (efeito sistêmico) (Figura 2). As discrepâncias entre estes resultados podem ser explicadas pelo coeficiente de variação obtido para os dois conjuntos de dados. Enquanto que para a AACPD o CV foi de 7%, o obtido para a severidade foi de 17%, não permitindo, possivelmente, a detecção de diferenças sutis entre os tratamentos.

A redução na AACPD observada no tecido não tratado (terceiro trifólio) pode ser explicada pela translocação de sinais provenientes das folhas tratadas para os demais tecidos, resultando na indução de resistência. Entretanto, este efeito foi menor quando comparado ao obtido em tecido tratado (segundo trifólio). Sabe-se que a resistência induzida sistemicamente geralmente é caracterizada por menor eficiência e durabilidade (RYALS; UKNES; WARD, 1994; GUZZO; MARTINS, 1996; GOZZO, 2003; STADNIK; MARASCHIN, 2004; FERNANDES, 2007).

A severidade da antracnose foi avaliada, neste experimento também em uma linhagem resistente selecionada de uma população segregante do cv. Uirapuru. Essa linhagem não apresentou sintomas da antracnose (Figura 2). No entanto, 4 dias após a inoculação foram visualizados pontos necróticos no tecido do mesofilo (Figura 3A), que corresponderiam possivelmente à reação de hipersensibilidade. A resistência de cultivares de *P. vulgaris* à raça 73 de *C. lindemuthianum* vem sendo estudada e, até o momento, foram identificadas várias fontes de resistência, dentre elas pode-se citar os cv. Kaboon (Co-1<sup>2</sup>) (MELLOTO; KELLY, 2000), G2333 (Co-5) (PEREIRA; SANTOS, 2004) e Widusa (Co-1<sup>5</sup>) (GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY, 2006), todas governadas por um único gene dominante. A interação feijoeiro-antracnose segue o modelo gene-a-gene (VENEULT-FOURREY; LAUGÉ; LANGIN, 2005). Assim, a presença de resistência monogênica dominante em plantas de *P. vulgaris* leva possivelmente a RH, bloqueando o desenvolvimento de *Cl* (VENEULT-FOURREY; LAUGÉ; LANGIN, 2005; O'CONNELL; BAILEY, 1988). A interação entre o gene Co-2 e seu respectivo gene de avirulência presente no fungo *C. lindemuthianum* leva ao desenvolvimento da RH (VENEULT-FOURREY; LAUGÉ; LANGIN, 2005).

Após o reconhecimento do patógeno, novos mecanismos de defesa são ativados, os quais envolvem a formação de tiloses, papilas, camadas de cortiça e de abscisão, produção de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e espécies ativas de oxigênio (AOS's) (STADNIK; MARASCHIN, 2004).

As peroxidases (POX) pertencem à classe PR-9 de proteínas relacionadas à patogênese e estão envolvidas no espessamento da parede celular catalisando a deposição de lignina em resposta ao ataque de patógenos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999), enquanto que as  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) são enzimas pertencentes à classe PR-2 de proteínas relacionadas à patogênese e estão envolvidas na degradação de polímeros de  $\beta$ -1,3-glucana, um dos principais componentes da parede celular de fungos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; CORNELISSEN; MELCHERS, 1993).

Geralmente, os agentes indutores de resistência não causam uma elevação na atividade de POX antes da inoculação (STADNIK; BETTIOL, 2007; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007). Por outro lado, no presente trabalho, a pulverização de ulvana elevou, em todos os momentos avaliados, a atividade das enzimas POX e GLU em plantas não inoculadas (Tabelas 8 e 9). O efeito deste polissacarídeo sobre

atividade enzimática pode ser explicado de duas maneiras: (1) o polissacarídeo ulvana poderia fornecer nutrientes aos microorganismos presentes no filoplano que, ao tentarem invadir as células vegetais, desencadeariam, por sua vez, respostas de defesa, tais como a elevação da atividade enzimática. Um aumento na população de *Methylobacterium* spp., uma bactéria não patogênica amplamente distribuída na filosfera, eleva a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase, peroxidases, glucanases e quitinases em plantas de arroz (*Oriza sativa*) (MADHAIYAN *et al.*, 2004); (2) a aplicação de ulvana poderia ter sensibilizado as células de *P. vulgaris*, aumentando sua capacidade de mobilizar respostas de defesa. A resistência induzida está frequentemente associada com o *Priming* (ORTMANN; CONRATH; MOERCHBACHER, 2006), onde plantas/células tratadas com um agente indutor tornam-se sensibilizadas (*primed*) podendo ativar respostas de defesa mais rápidas e intensas se submetidas a estresses abióticos ou ao ataque de patógenos ou insetos (PAULERT; STADNIK; MOERCHBACHER, 2008; JUNG *et al.*, 2009; CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002). O tratamento de culturas de células de trigo com exopolissacarídeos provenientes da bactéria *Erwinia herbicola*, eleva em cerca de 100% a atividade de peroxidases, além de potencializar a explosão oxidativa gerada pela aplicação posterior de quitina e de quitosana (ORTMANN; MOERSCHBACHER, 2006).

A capacidade de sensibilizar células (*Priming*) foi recentemente descrita para a ulvana por Paulert, Stadnik e Moerchbacher (2008). Segundo estes autores, a pré-incubação de culturas de células de trigo e de arroz com ulvana potencializou a explosão oxidativa gerada pela aplicação posterior de quitina, quando comparada a sua aplicação isoladamente.

A indução de resistência e o *priming* podem resultar em gastos desnecessários para a planta, especialmente em casos de ausência de patógenos (WALTERS; HEIL, 2007; HEIL, 2007). Os custos mais comuns são: custos de alocação, custos ecológicos e custos genéticos. Os custos de alocação envolvem o direcionamento de recursos que poderiam ser utilizados para o crescimento ou reprodução. Os custos ecológicos estão relacionados com os efeitos negativos da resistência induzida sobre as interações da planta com o ambiente e os custos genéticos estão relacionados com os efeitos dos genes de resistência sobre os genes envolvidos no desenvolvimento da planta (WALTERS; HEIL, 2007; HEIL, 2007). No entanto, os custos envolvidos na resistência induzida parecem ser maiores que os do *priming*. Por exemplo, o *priming* induzido em *Arabidopsis thaliana* por pequenas doses do ácido  $\beta$ -aminobutírico

causa uma pequena redução na taxa de crescimento e não afeta a produção de sementes, enquanto que a resistência induzida diretamente por doses maiores do ácido ou pelo benzotiadiazol afeta fortemente ambos os fatores (VAN HULTEN *et al.*, 2006).

A atividade de peroxidases (POX) foi sempre maior em plantas resistentes, independente de serem inoculadas ou não (Tabela 8). A maior atividade de POX em plantas resistentes não inoculadas sugere que esta enzima está presente em maior quantidade em condições naturais nestas plantas. Uma alta atividade de POX em linhagens de plantas antes da inoculação tem sido associada com a resistência a patógenos (SHIMONI; BAR-ZUR; REUVENI, 1991; REUVENI *et al.*, 1992), por exemplo: a atividade de POX, antes da inoculação, é maior nas linhagens de milho B37HtN e B73HtN, quando comparada às linhagens B37 e B73, respectivamente. Após a inoculação com o fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.), as linhagens B37HtN e B73HtN mostraram-se resistentes ao fungo, enquanto que as linhagens B37 e B73 foram suscetíveis (SHIMONI; BAR-ZUR; REUVENI, 1991).

A inoculação elevou a atividade de POX em plantas resistentes e tratadas com ulvana somente às 48 HAI, enquanto que para plantas suscetíveis, a presença do fungo não alterou a atividade desta enzima (Tabela 8). Considerando que a enzima POX está envolvida no espessamento da parede celular em resposta ao ataque de patógenos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999), pode-se sugerir que a elevação da atividade desta enzima, às 48 HAI em plantas resistentes e tratadas com ulvana, esteja relacionada com o reconhecimento do patógeno e ativação de mecanismos de defesa. Sabe-se que na maioria das interações entre plantas e fungos, a resistência inata atua no reconhecimento rápido e específico do patógeno, levando à indução de respostas de defesa, tais como a produção de AOS's, reforço da parede celular, síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas PR) (VENEVAULT-FOURREY; LAUGÉ; LANGIN, 2005). A interação entre plantas resistentes de *P. vulgaris* e *P. syringae* pv. *phaseolicola* eleva a atividade de enzimas envolvidas na produção e utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tais como as peroxidases e xantina oxidase e reduz a atividade de enzimas envolvidas na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como as catalases (MILOSEVIC; SLUSARENKO, 1996). O processo de lignificação em pepino ocorre mais rapidamente em plantas resistentes e suscetíveis tratadas com um agente indutor (*C. lagenarium*), bloqueando a penetração do fungo *C. lagenarium* (HAMMERSCHMIDT; KUC, 1982).

A atividade de glucanases (GLU) não diferiu entre plantas resistentes e suscetíveis, independe de serem inoculadas ou não, exceto às 48 HAI em plantas não inoculadas (Tabela 9). Uma hipótese pode ser levantada para a explicação desses resultados: a atividade de GLU pode ser elevada, em plantas resistentes, em um momento posterior às 48 HAI. A atividade de glucanases em plantas de *P. vulgaris* foi maior somente 5 dias após a inoculação com *Cl* (DANN *et al.*, 1996). Por outro lado, o acúmulo de transcritos da PR-2 (glucanases) é detectado em plantas de *P. vulgaris* a partir da adesão e germinação de conídios de *Cl* na superfície foliar (VENEULT-FOURREY; LAUGÉ; LANGIN, 2005).

A pulverização de ulvana elevou a atividade de GLU em plantas inoculadas em todos os momentos avaliados (Tabela 9). A pulverização de ulvana elevou a atividade GLU em plantas de *P. vulgaris* moderadamente suscetíveis a *U. appendiculatus*, mas não afetou a atividade desta enzima em plantas resistentes (BORSATO, 2009). Estes resultados sugerem que a ulvana tenha induzido a expressão de genes relacionados com a síntese de glucanases. Por outro lado, a aplicação preventiva de ulvana em plantas de *Arabidopsis thaliana* (STADNIK *et al.*, 2009) e de *Medicago truncatula* (CLUZET *et al.*, 2004) não induz a expressão de genes envolvidos na síntese de glucanases.

A germinação de conídios de *Cl* não foi afetada pela resistência inata, exceto às 24 HAI (Tabela 10). De fato, sabe-se que a germinação de conídios e a formação de apressórios de *Colletotrichum* spp. são semelhantes tanto em plantas resistentes quanto em plantas suscetíveis (WHARTON; JULIAN; O'CONNELL, 2001; BENTES; MATSUOKA, 2002).

A formação de apressórios não foi influenciada pela resistência inata, exceto às 12 HAI quando plantas resistentes apresentaram maior número de apressórios formados (Tabela 10). Fernandes (2007) relatou maior formação de apressórios de *Cl* em plantas resistentes de *P. vulgaris*. Estes resultados sugerem que os mecanismos de defesa presentes na linhagem resistente atuam em fases posteriores à infecção.

A pulverização de ulvana causou um atraso transiente na germinação de conídios e na formação de apressórios de *Cl* em plantas de *P. vulgaris* (Tabela 10). Fernandes (2007) relatou uma redução na germinação de conídios de *Cl* em plantas de *P. vulgaris* tratadas com ulvana. Por outro lado, a ulvana não influenciou a germinação de esporos de *U. appendiculatus* em plantas de *P. vulgaris* (BORSATO, 2009). Duas hipóteses podem ser levantadas para a explicação destes resultados, de acordo com Fernandes (2007), (1) a ulvana possui capacidade de formar quelatos na presença de íons boro e cálcio (HAUG,

1976; CHIOVITTI *et al.*, 2001), o que poderia sequestrar cátions essenciais para a germinação dos conídios e a diferenciação dos apressórios do fungo (WARWAR; DICKMAN, 1996; AHN *et al.*, 2006). (2) a ulvana poderia fornecer nutrientes para microorganismos presentes na superfície foliar que poderiam, por sua vez, produzir substâncias antimicrobianas como as produzidas por diversos isolados de *Bacillus* spp. contra o fungo *C. acutatum*, em frutos cítricos (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003). Assim, são necessários novos estudos para avaliar os possíveis efeitos da ulvana sobre a germinação de conídios e formação de apressórios de *Cl*.

A superfície aérea das plantas fornece habitat para diversos microorganismos, sendo que muitos destes podem afetar o desempenho e a qualidade da produção das plantas, bem como o crescimento de patógenos (BLAKEMAN; FOKKEMA, 1982; WHIPPS *et al.*, 2008).

O elevado número de células hipersensitivas bem como o acúmulo de peróxido de hidrogênio (Tabela 11 e Figuras 4C e D) observados em plantas resistentes sugerem que a interação entre a raça 73 de *Cl* e a linhagem resistente do cv. Uirapuru leva ao desenvolvimento da RH. Por outro lado, Fernandes (2007) não observou diferenças no número de células hipersensitivas em cultivar de *P. vulgaris* com resistência monogênica e cv. suscetível à raça 73 de *Cl*. Esta discrepância entre resultados pode ser explicada pelas diferentes metodologias utilizadas na avaliação da RH, enquanto que neste estudo foi utilizada a diaminobenzidina (DAB) que forma polímeros na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidases (HÜCKELHOVEN *et al.*, 1999), Fernandes (2007) não utilizou metodologia específica para a visualização da RH. Além disso, no presente estudo foi utilizada uma linhagem resistente da cv. Uirapuru, esta cultivar foi originada do cruzamento entre (IAPAR BAC 29 x PR1711) x [NEP 2 x (PUEBLA 173 x ICAPUJAO)] (MODA-CIRINO *et al.*, 2001), enquanto que Fernandes (2007) utilizou a cv. Valente originada do cruzamento entre (ENGOBA 201 – OURO x ÔNIX x NA 512486) (ALBRECHT; CARVALHO, 2004). Estas cultivares apresentam origens diferentes e, possivelmente, diferentes genes de resistência à raça 73 de *Cl*.

A pulverização de ulvana reduziu o número de células hipersensitivas às 24 HAI em plantas de *P. vulgaris* (Tabela 11). Estes resultados sugerem que este polissacarídeo induz resistência por uma via independente da RH. A resistência induzida em plantas de *P. vulgaris*, pela aplicação do benzotiadiazol contra a ferrugem (*U. appendiculatus*), é independente da RH (IRITI; FAORO, 2003). O benzotiadiazol atua

inibindo a atividade de catalases e ascorbato peroxidases, elevando os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entretanto, estes níveis não atingem concentrações suficientes para causar a morte das células, pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é utilizado por enzimas tais como as peroxidases que são relativamente abundantes em *P. vulgaris* (IRITI; FAORO, 2003). Por outro lado, Fernandes (2007) observou um maior número de células com RH em plantas de *P. vulgaris* ( cv. Uirapuru) previamente tratadas com ulvana e inoculadas com a raça 73 de *C. lindemuthianum*. Assim, são necessários novos estudos para avaliar os efeitos da ulvana sobre a reação de hipersensibilidade em plantas de *P. vulgaris*.

No presente trabalho, os inertes caulinita e sílica amorfa não influenciaram a eficiência da ulvana em elicitar respostas de defesa em plantas de *P. vulgaris* contra o fungo *C. lindemuthianum*, durante o período de um ano (Figura 5). Sabe-se que a correta seleção do inerte pode aumentar a vida de prateleira e a eficiência do ingrediente ativo (WARD, 1984; MEDUGNO, 2007). Até o presente momento, o preparo de formulações utilizando polissacarídeos como ingredientes ativos tem sido pouco estudado.

Apesar do nome inerte, este produto é quimicamente ativo, podendo alterar o pH da solução, melhorar a suspensibilidade, prevenir a compactação, atuar na absorção de substâncias que poderiam afetar o ingrediente ativo e na retenção de umidade. Estas propriedades permitem a alteração do microambiente em torno do ingrediente ativo melhorando o armazenamento, a manipulação e a aplicação do produto (WARD, 1984; MEDUGNO, 2007).

Os produtos sílica amorfa e caulinita são tidos como inertes (WARD, 1984; MEDUGNO, 2007). No entanto podem, em alguns casos, induzir resistência em plantas, por terem em sua composição o silício (Si). A adição de silício no solo reduz a incidência da antracnose em feijoeiro (MORAES *et al.*, 2010) e induz o acúmulo de fitoalexinas em plantas de pepino contra o fungo *Sphaerotheca fuliginea* (Schltdl.) Pollacci (oídio) (FAWE *et al.*, 1998).

O inerte atapulgita reduziu em todos os momentos avaliados a eficiência do polissacarídeo ulvana em elicitar respostas de defesa em plantas de *P. vulgaris* contra o fungo *C. lindemuthianum* (Figura 4). Considerando que o inerte pode interagir com o ingrediente ativo (WARD, 1984; MEDUGNO, 2007; KNOWLES, 2008), pode-se sugerir que ocorreram interações entre as partículas da atapulgita e o polissacarídeo ulvana. Sabe-se que partículas de argila (montimorilonita) podem flocular na presença de sais e polissacarídeos, através da anulação da

repulsão eletrostática por parte dos sais, possibilitando a aproximação das partículas de argila e posterior formação de ligações entre elas através da adsorção de macromoléculas (LABILLE *et al.*, 2005). Para a formação destes aglomerados dois mecanismos são propostos: (1) o hidrogênio do radical hidroxila do polissacarídeo poderia se ligar ao oxigênio presente na superfície da argila, ou (2) o radical hidroxila da argila poderia se ligar ao oxigênio do polissacarídeo (LABILLE *et al.*, 2005). Além da presença de sais, as interações são influenciadas pelo grau de dispersão, tamanho, forma e propriedades superficiais das partículas de argila (THENG, 1970; LABILLE *et al.*, 2005). A montmorilonita possui a seguinte fórmula empírica:  $(\text{Na}, \text{Ca})_{0,3}(\text{Al}, \text{Mg})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Além de possuírem composição química semelhante, a montmorilonita e a atapulgita apresentam fortes propriedades adsorventes (WARD, 1984). Durante o preparo dos tratamentos para a aplicação, foi observado que o tratamento contendo o inerte atapulgita apresentou, em todos os momentos avaliados, uma maior dificuldade de dissolução e a formação de aglomerados de partículas.

A ulvana não formou aglomerados de partículas com a caulinita (argila), como os observados na formulação contendo atapulgita. Isto pode ser explicado pela estrutura química destes compostos, enquanto a caulinita é estruturada em duas camadas, uma delas de tetraedros de óxido de silício e outra de octaedros de óxido de alumínio, a atapulgita apresenta uma estrutura em forma de cadeia de tetraedros de óxido de silício ligados por octaedros de oxigênio e hidroxilas contendo cátions alumínio e magnésio (WARD, 1984). Sabe-se que as variações estruturais são responsáveis por alterar propriedades físico-químicas das argilas, tais como a carga da superfície, influenciando suas propriedades adsorventes (WARD, 1984).

Por fim, pode-se concluir que a germinação de conídios e a formação de apressórios de *Cl* não foram afetadas pela resistência inata ou pela induzida por ulvana. A resistência inata de *P. vulgaris* à raça 73 do fungo *C. lindemuthianum* parece estar associada com o rápido reconhecimento do patógeno, com a reação de hipersensibilidade e com a elevada atividade de POX. A redução da antracnose em plantas tratadas com ulvana parece estar relacionada com o aumento da atividade de POX e GLU. A eficiência da ulvana foi reduzida pela formulação contendo atapulgita, mas não pela que continha sílica amorfa ou caulinita.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-GALLEGOS, J. A.; KELLY, J. D.; GEPTS, P. Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. **Crop Science**, v. 47, p. S44-S59, 2007.

AEROSIL. **AEROSIL 200, Sílica Pirogênica Hidrofílica**. Disponível em: < <http://www.aerosil.com/aerosil/en/solutions/productgroups/>>. Acesso em: 13 ago 2009.

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

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons/](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/)>. Acesso em: 20 fev 2010.

AHN, I. P.; KIM, S.; CHOI, W. B.; LEE, Y. H. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by polyamines in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting red pepper. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 237-241, 2003.

ALBRECHT, J. C.; CARVALHO, W. P. **BRS Valente: nova cultivar de feijoeiro comum do grupo comercial preto para o Distrito Federal e noroeste mineiro**. Comunicado Técnico, Distrito Federal: Embrapa Cerrado, n. 109, 2004, 3p.

ARAUJO, 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.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, 1992. p.88-120.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 79-83, 2001.

BASF. **Attagel 50 Engelhard**. Disponível em: < [http://www.performancechemicals.basf.com/ev-wcmsn/internet/en\\_GB/portal/show-content\\_cps/content/EV/EV1/prod/attapulgite/attagel](http://www.performancechemicals.basf.com/ev-wcmsn/internet/en_GB/portal/show-content_cps/content/EV/EV1/prod/attapulgite/attagel)>. Acesso em: 13 ago 2009.

BEEBE, S. E.; PASTOR-CORRALES, M. Breeding for disease resistance. In: VAN SCHOONHOVEN, A.; VOYSEST, O. **Common beans: Research for crop improvement**. Wallingford: CAB/CIAT, 1991. p. 561-610.

BEFFA, R.; MEINS JR, F. Pathogenesis-related functions of plant  $\beta$ -1,3-glucanases investigated by antisense transformation a review. **Gene**, v. 179, p. 97-103, 1996.

BENTES, J. L. S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 71-77, 2002.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 376 - 399.

BLAKEMAN, J. P.; FOKKEMA, N. J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 20, p. 167-192, 1982.

BORSATO, L. C. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem e mecanismos de defesa elicitados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus*. 101p. 2009.

BÖKER-TÔRRES, M. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Composição florística do macrofitobentos da Lagoa da Conceição (Florianópolis-SC). 74p. 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, p. 248-254, 1976.

CHAVES, G. M. La antracnosis. In: SCHWARTZ, H.; GALVEZ, G. E. **Problemas de producción del frijol**. Cali: CIAT, 1980. p. 37-53.

CHEN, H.; WANG, A. Kinetic and isothermal studies of lead ion adsorption onto palygorskite clay. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, p. 309-316, 2007.

CHIOVITTI, A.; KRAFT, G. T.; BACIC, A.; LIAO, M. L. Gelling polysaccharides from Australian seaweeds: research and potential. **Marine Freshwater Research**, v. 52, p. 917-935, 2001.

CHIZHOV, A. O.; DELL, A.; MORRIS, H. R.; REASON, A. J.; HASLAM, S. M.; MCDOWELL, R. A.; CHIZHOV, O. S.; USOV, A. I. Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. **Carbohydrate Research**, v. 310, p. 203-210, 1998.

CIPOLLINI, D. F. Jr. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. **American Journal of Botany**, v. 85, p. 1586-1591, 1998.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITTE, 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, n. 7, p. 917-928, 2004.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 210-216, 2002.

CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 101, p. 709-712, 1993.

CUOMO, V.; PERRETTI, A.; PALOMBA, I.; VERDE, A.; CUOMO, A. Utilization of *Ulva rigida* biomass in the Venice Lagoon (Italy): biotransformation in compost. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 479-485, 1995.

DANN, E. K.; MEUWLY, P.; MÉTRAUX, J. P.; DEVERALL, B. J. The effect of pathogen inoculation or chemical treatment on activities of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase and accumulation of salicylic acid in leaves of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 307-319, 1996.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 32, p. 479-501, 1994.

DOGAN, M.; YILMAZ, Z.; ALKAN, M. Characterization and rheological properties of kaolinite – silicon oil pastes. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 8218-8227, 2008.

DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L. **Produção de feijão**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 385 p.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>>. Acesso em: 12 ago 2009.

FAWE, A.; ABOU-ZAID, M.; MENZIES, J. G.; BÉLANGER, R. R. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. **Phytopathology**, v. 88, p. 396-401, 1998.

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.). 85p. 2007.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151, p. 411-419, 2006.

GONZÁLEZ-PRADAS, E.; SOCÍAS-VICIANA, M.; UREÑA-AMATE, M. D.; CANTOS-MOLINA, A.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M. Adsorption of chloridazon from aqueous solution on heat and acid treated sepiolites. **Water Research**, v. 39, p. 1849-1857, 2005.

GOZZO, F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4487-4503, 2003.

GROTH, D.H.; MOORMAN, W. J.; LYNCH, D. W.; STETTLER, L. E.; WAGNER, W. D.; HORNING, R. W. Chronic effects of inhaled amorphous silica in animals. In; DUNNOM, D. D. (Ed.). **Health effects of synthetic silica particulates**. Baltimore: American Society for Testing and Materials, 1981, p. 118-143.

GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 449-454, 1996.

HAMMERSCHIMIDT, R. Induced Disease Resistance: How to Induce Plants Stop Pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 77-84, 1999.

HAMMERSCHIMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 1 – 7.

HAMMERSCHIMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 61-71, 1982.

HAMMERSCHIMIDT, R.; NUCKLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

HAPGOOD, K. P. Colloidal silicon dioxide. In: ROWE, R.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (Eds.). **Pharmaceutical Excipients**. 6. Ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009, p. 185-188.

HAUG, A. The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulfated polysaccharide from *Ulva lactuca*. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 30, p.562.566, 1976.

HEIL, M. Trad-offs associated with induced resistance. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). **Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007, p. 157-177.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

HÜCKELHOVEN, R.; FODOR, J.; PREIS, C.; KOGEL, K. H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1251-1260, 1999.

IAPAR. **Principais características das cultivares de feijão com sementes disponíveis no mercado**. Disponível em: <[http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/fcultfeijao.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/fcultfeijao.pdf)>. Acesso em: 28 agosto 2008.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, 2008. 130p.

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

JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relação entre estrutura a foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 217-223, 2005.

JOHNSTON, C. J.; DRISCOLL, K. E.; FINKELSTEIN, J. N.; BAGGS, R.; O'REILLY, M. A.; CARTER, J.; GELEIN, R.; OBERDORSTER, G. Pulmonary chemokine and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of amorphous and crystalline silica. **Toxicological Sciences**, v. 56, p. 405-513, 2000.

JUNG, H. W.; TSCHAPLINSKI, T. J.; WANG, L.; GLAZEBROOK, J.; GREENBERG, J. T. Priming in systemic plant immunity. **Science**, v. 324, p. 89-91, 2009.

KING, R. J. Kaolinite. **Geology Today**, v. 25, n. 2, p. 75-78, 2009.

KISLENKO, V. N.; VERLINSKAYA, R. M. Adsorption of aminoalkylated polyacrylamide on montmorillonite and palygorskite. **Colloid Journal**, v. 63, n. 1, p. 74-77, 2001.

KNOWLES, A. Recent developments of safer formulations of agrochemicals. **Environmentalist**, v. 28, p. 35-44, 2008.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 251-257, 2003.

LABILLE, J.; THOMAS, F.; MILAS, M.; VANHAVERBEKE, C. Flocculation of colloidal clay by bacterial polysaccharides: effect of macromolecule charge and structure. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 149-156, 2005.

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

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade Nutricional. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996, p. 71-99.

LÉPAGNOL-DESCAMPS, V.; RICHARD, C.; LAHAYE, M.; POTIN, P.; YVIN, J. C.; KLOAREG, B. Purification and determination of the action pattern of *Haliothis tuberculata* laminarinase. **Carbohydrate Research**, v. 310, p. 283-289, 1998.

LIMA-FILHO, J. V. M.; CARVALHO, A. F. F. U.; FREITAS, S. M.; MELO, V. M. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, n. 4, p. 311-314, 2002.

LOFFAGUEN, J. C.; HARTMANN, O. E. L.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos naturais no controle da antracnose e na produtividade do feijoeiro. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2004, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29 (suplemento), p. 107-107, 2004.

LOFFAGUEN, J. C.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Identificação da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose-do-feijoeiro, em dois municípios do Alto Vale do Itajaí, SC. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 18, n. 2, p. 87-89, 2005.

LOW, P. S.; MERIDA, J. R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiologia Plantarum**, v. 96, p. 533-542, 1996.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.; YANG, J.; SUNDARAM, S.; TONGMIN, S. A. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 54, p. 315-324, 2004.

MAHUKU, G. S.; JARA, C. E.; CAJIAO, C.; BEEBE, S. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, v. 86, p. 1383-1387, 2002.

MAUCH, F.; STAEHELIN, L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in bean leaves. **The Plant Cell**, v. 1, p. 447-457, 1989.

MEDUGNO, C. Roteiro para formulação experimental de pó molhável de biopesticida (sigla internacional WP). In: VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; MELO, I. S. de. (Ed). **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. P. 109-115.

MEDUGNO, C. C.; FERRAZ, J. M. G.; MAIA, A. H. N.; FREITAS, C. C. L. Evaluation of a wettable powder formulation for the nuclear polyhedrosis vírus of *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). **Pesticide Science**, v. 51, p. 153-156, 1997.

MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, v. 105, p. 467-472, 1994.

MELOTTO, M.; KELLY, J. D. An allelic series at the *Co-1* locus conditioning resistance to anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, v. 116, p. 143-149, 2000.

MILOSEVIC, N.; SLUSARENKO, A.J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, p. 143-158, 1996.

MODA-CIRINO, V.; OLIARI, L.; LOLLATO, M. A.; FONSECA JÚNIOR, N. S. IPR88 Uirapuru – common bean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 205-206, 2001.

MONTE PASCOAL. **Caulim Extra Fino**. Disponível em: <[http://www.montepascoal.com/produtos\\_EF.asp](http://www.montepascoal.com/produtos_EF.asp)>. Acesso em: 13 ago 2009.

MORAES, S. R. G.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, P. E. Nutrição do feijoeiro e intensidade da antracnose em função da aplicação de silício e cobre. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 283-291, 2009.

O'CONNELL, R.; BAILEY, J. A. Differences in the extent of fungal development, host cell necrosis and symptom expression during race-cultivar interactions between *Phaseolus vulgaris* and *Colletotrichum lindemuthianum*. **Plant Pathology**, v. 37, p. 351-362, 1988.

O'CONNELL, R.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, W.; DICKMAN, M. B. *Colletotrichum*: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. St. Paul: APS Press, 2000, p. 57-77.

ORTMANN, I.; CONRATH, U.; MOERSCHBACHER, B. M. Exopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. **FEBS Letters**, v. 580, p. 4491-4494, 2006.

ORTMANN, I.; MOERSCHBACHER, B. M. Spent growth medium of *Pantoea agglomerans* primes wheat suspension cells for augmented accumulation of hydrogen peroxide and enhanced peroxidase activity upon elicitation. **Planta**, v. 224, p. 963-970, 2006.

PALMIERI, A. Attapulgit. In: ROWE, R.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (Eds.). **Pharmaceutical Excipients**. 6. Ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009, p. 51-52.

PALMIERI, A. Kaolin. In: ROWE, R.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. (Eds.). **Pharmaceutical Excipients**. 6. Ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2009, p. 352-354.

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.

PASTOR-CORRALES, M. A. Estandarizacion de Variedades Diferenciales y de Designacion de Razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v. 81, p. 694, 1991.

PAULERT, R.; SMANIA JÚNIOR, J.; 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. 123, p. 123-130, 2007.

PAULERT, R.; STADNIK, M. J.; MOERSCHBACHER, B. M. Priming and elicitor activities of an oxidative burst in wheat, rice and *Medicago truncatula* cells by a polysaccharides from green seaweed. In: Arbeitskreis Wirt-Parasit-Beziehungen, 2008, Bonn (Alemanha). Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. Stuttgart : Ulmer Verlag, v. 60. p. 166-167, 2008.

PAULERT, R.; TALAMINI, V.; CASSOLATO, J. E. F.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; SMANIA JÚNIOR, A.; STADNIK, M. J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from Green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263-270, 2009.

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W.; ZHI'EN, L. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, n. 15, p. 21-27, 2003.

PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B. Genetic constitution of anthracnose-resistance in common bean lines. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 422-426, 2004.

PERFECT, S. E.; BLEDDYN HUGHES, H.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.

POTGIETER, J. H.; POTGIETER-VERMAAK, S. S.; KALIBANTONGA, P. D. Heavy metals removal from solution by palygorskite clay. **Minerals Engineering**, v. 19, p. 463-470, 2006.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 388-391, 1993.

RAY, B.; LAHAYE, M.; Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. **Carbohydrate Research**, v. 274, p. 313-318, 1995.

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. 123-130, 2003.

REUVENI, R.; SHIMONI, M.; KARCHI, Z.; KUC, J. Peroxidase activity as a biochemical marker for resistance of muskmelon (*Cucumis melo*) to *Pseudoperonospora cubensis*. **Phytopathology**, v. 82, n. 7, p. 749-753, 1992.

ROBIC, A.; SASSI, J. F.; LAHAYE, M. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 344-352, 2008.

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1109-1112, 1994.

SARTORATO, A. Antracnose. In: ZIMMERMANN, M. J.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do Feijoeiro: Fatores que Afetam a Produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1988, p. 457-477.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; RIOS, G. P. Doenças Fúngicas e Bacterianas da Parte Aérea. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996, p. 71-99.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A.; FARIA, J. C. **Doenças de métodos de controle**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/index.htm>>. Acesso em: 05 ago 2009.

SCHWARTZ, H. F. Anthracnose. In: HALL, R. **Compendium of Bean Diseases**. St. Paul: APS, 1994, p. 16-17.

SHIMONI, M.; BAR-ZUR, A.; REUVENI, R. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Journal of Phytopathology**, v. 131, p. 315-321, 1991.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

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

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W. Association between lipoxygenase and peroxidase activity and systemic protection of cucumber plants against *Podospaera xanthii* induced by *Oudemansiella canarii* extracts. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 114, n. 1, p. 9-13, 2007.

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, p. 25-34, 2000.

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: CCA/UFSC, 2004, p. 221-244.

STADNIK, M. J.; PAULERT, R. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. **Museu Nacional de Rio de Janeiro**, v. 30, p. 267-279, 2007.

STADNIK, M. J.; STEINHAUSER, C.; FREITAS, M. B.; POGANY, M.; GOESSL, L.; DURNER, J. Ulvan-induced resistance to *Alternaria brassicicola* in *Arabidopsis* is salicylic acid-independent but characterized by *PR-1* accumulation. In XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Rio de Janeiro, **Anais.....873**, 2009.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J.; (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992, p. 1-26.

TAKEUCHI, H.; HANDA, T.; KAWASHIMA, Y. Spherical solid dispersion containing amorphous tolbutamide embedded in enteric coating polymers or colloidal silica prepared by spray-drying technique. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n.9, p. 3800-3806, 1987.

TALAMINI, V.; SOUZA, E. A. de; POZZA, E. A.; CARRIJO, F. R. F.; ISHIKAWA, F. H.; SILVA, K. J. D.; OLIVEIRA, F. A. de. Identificação de raças patogênicas de *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de isolados provenientes de regiões produtoras de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 3, p. 371-375, 2004.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. (Eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004, p. 45-62.

THAUNG, M. M. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. **Mycoscience**, v. 49, p. 345-350, 2008.

THENG, B. K. G. Interactions of clay minerals with organic polymers. Some practical applications. **Clays and Clay Minerals**, v. 18, p. 357-362, 1970.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, v. 11, n. 6, p. 1187-1194, 1997.

VAN DEN BULCKE, M.; BAUW, G.; CASTRESANA, C.; VAN MONTAGU, M.; VANDEKERCKHOVE, J. Characterization of vacuolar and extracellular  $\beta(1,3)$ -glucanases of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 2673-2677, 1989.

VAN DER PLANK, J. E. **Principles of plant infection**. New York: Academic Press, 1975, 216p.

VAN EERDENBRUGH, B.; VAN SPEYBROECK, M.; MOLLS, R.; HOUTHOOFD, K.; MARTENS, J. A.; FROYEN, L.; VAN HUMBEECK, J.; AUGUSTIJNS, P.; VAN DEN MOOTER, G. Itraconazole/TPGS/Aerosil®200 solid dispersions characterization, physical stability and *in vivo* performance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 270-278, 2009.

VAN HULTEN, M.; PELSER, M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J.; TON, J. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 14, p. 5602-5607, 2006.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VERNAULT-FOURREY, C.; LAUGÉ, R. LANGIN, T. Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, p. 4761-4770, 2005.

VIEIRA, C. V.; BOREM, A.; RAMALHO, M. A. P.; CARNEIRO, J. E. S. Melhoramento do feijão. In: BOREM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005, p. 301-393.

VILHORDO, B. W.; MIKUSINSKI, O. M. F.; BURIN, M. E.; GANDOLFI, V. H. Morfologia. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996, p. 71-99.

WALTERS, D.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, p. 3-17, 2007.

WANG, L.; DE CUI, F.; SUNADA, H. Preparation and evaluation of solid dispersions of nitrendipine prepared with fine silica particles using the melt-mixing method. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 1, p. 37-43, 2006.

WARD, M. G. Formulation of biological insecticides. In: SCHER, H.B. (Ed.). **Advances in Pesticide Formulation Technology**. American Chemical Society, 1984, p. 175-184.

WARR, L. N.; PERDRIAL, J. N.; LETT, M. C.; HEINRICH-SALMERON, A.; KHODJA, M. Clay mineral-enhanced bioremediation of marine oil pollution. **Applied Clay Science**, v. 46, p. 337-345, 2009.

WARWAR, V.; DICKMAN, M. B. Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 74-79, 1996.

WATANABE, T.; WAKIYAMA, N.; USUI, F.; IKEDA, M.; ISOBE, T.; SENNA, M. Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 81-91, 2001.

WATANABE, T.; HASEGAWA, S.; WAKIYAMA, N.; KUSAI, A.; SENNA, M. Prediction of apparent equilibrium solubility of indomethacin compounded with silica by C-13 solid state NMR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 248, p. 123-129, 2002.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O'CONNELL, R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 149-158, 2001.

WHIPPS, J. M.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G. D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1744-1755, 2008.

WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Micro-plate colourimetric assay for *endo*-acting cellulose, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.6, p. 511-519, 1992.

XUE, L.; CHAREST, P. M.; JABAJI-HARE, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- $\beta$ -glucanases, chitinases and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, v. 88, n. 4, 1998.

YOKOYAMA, L. P.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos Socioeconômicos da Cultura. In: ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. São Paulo: Potafos, 1996, p. 71-99.

ZHANG, J.; XIE, S.; HO, Y. S. Removal of fluoride ions from aqueous solution using modified attapulgite as adsorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 165, p. 218-222, 2009.

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o segundo trifólio (efeito local) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratada com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	1	9,245	7,098	0,037	21,7
Erro	6	1,303			

Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	1	544,500	15,604	0,008	16,0
Erro	6	34,900			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 2.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o segundo trifólio (efeito local) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratada com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose			
Tratamento	Média	Tukey	
Água	6,3	A	
Ulvana	4,2	B	

Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)			
Tratamento	Média	Tukey	
Água	45,1	A	
Ulvana	28,6	B	

**Anexo 3.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o terceiro trifólio (efeito sistêmico) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	1	0,661	0,788	0,409	16,9
Erro	6	0,840			

Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	1	44,650	5,276	0,061	6,6
Erro	6	8,460			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 4.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), para o terceiro trifólio (efeito sistêmico) de linhagem suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratada com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

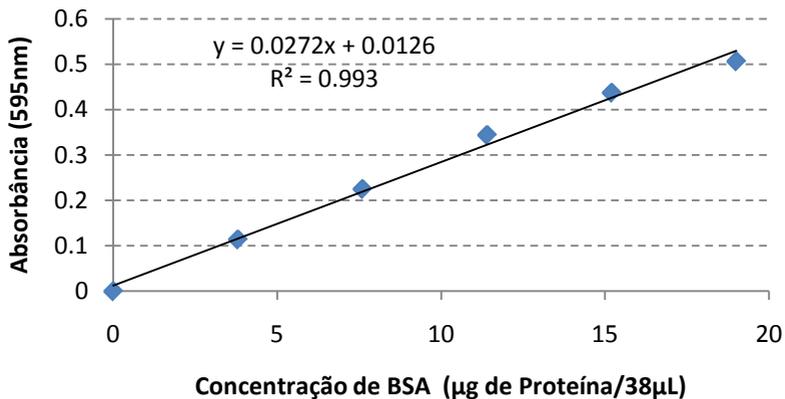
Severidade da antracnose			
Tratamento	Média	Tukey	
Água	5,7	A	
Ulvana	5,2	A	

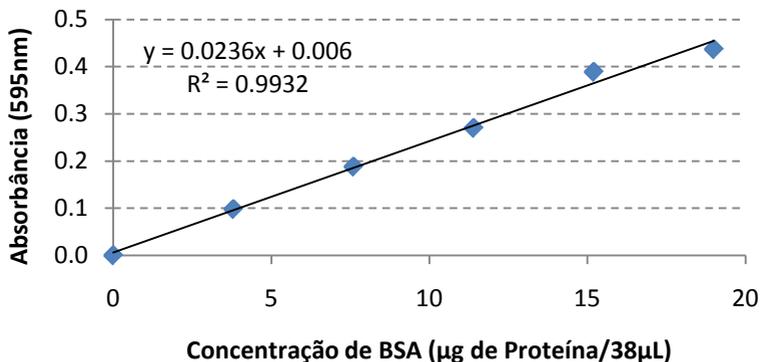
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)			
Tratamento	Média	Tukey*	
Água	46,4	A	
Ulvana	41,7	B	

\*Probabilidade de 7%.

**Anexo 5.** Curva padrão utilizando BSA (Albumina de soro bovino) e equação, utilizados para o cálculo do conteúdo de proteínas em amostras retiradas para a avaliação de peroxidases.



**Anexo 6.** Curva padrão utilizando BSA (Albumina de soro bovino) e equação, utilizados para o cálculo do conteúdo de proteínas em amostras retiradas para a avaliação de glucanases.



**Anexo 7.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de peroxidases ( $\Delta$  Abs. 470nm/min/mg Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	57,249	5,198	0,042	22,8
	Tratamento	1	21,670	1,967	0,186	
	Linhagem*Tratamento	1	25,044	2,274	0,158	
	Erro	12	11,015			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	44,588	6,078	0,030	19,6
	Tratamento	1	12,224	1,666	0,221	
	Linhagem*Tratamento	1	0,831	0,113	0,742	
	Erro	12	7,336			
HAI	Fonte de Variação*	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	1,170	28,595	0,000	7,2
	Tratamento	1	0,288	7,033	0,021	
	Linhagem*Tratamento	1	0,020	0,478	0,503	
	Erro	12	0,041			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação. \*Dados transformados para  $\text{Log}(x)$ .

**Anexo 8.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de peroxidases ( $\Delta$  Abs. 470nm/min/mg Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e não inoculadas.

HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	48,842	5,408	0,038	20,1
	Tratamento	1	89,547	9,915	0,008	
	Linhagem*Tratamento	1	23,191	2,568	0,135	
	Erro	12	9,032			
HAI	Fonte de Variação*	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	0,856	4,255	0,062	12,0
	Tratamento	1	1,490	7,412	0,019	
	Linhagem*Tratamento	1	0,430	2,137	0,169	
	Erro	12	0,201			
HAI	Fonte de Variação*	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	1,994	6,095	0,030	16,6
	Tratamento	1	1,947	5,952	0,031	
	Linhagem*Tratamento	1	0,021	0,065	0,803	
	Erro	12	0,327			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação. \*Dados transformados para  $\sqrt{x}$ .

**Anexo 9.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de glucanases (Absorbância a 600nm/mg de Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	0,946	0,476	0,504	10,0%
	Tratamento	1	39,094	19,653	0,001	
	Linhagem*Tratamento	1	0,004	0,002	0,963	
	Erro	12	1,989			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	8,693	1,918	0,191	12,2%
	Tratamento	1	147,606	32,574	0,000	
	Linhagem*Tratamento	1	1,698	0,375	0,552	
	Erro	12	4,531			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	2,751	1,285	0,279	9,8%
	Tratamento	1	24,506	11,445	0,005	
	Linhagem*Tratamento	1	8,892	4,153	0,064	
	Erro	12	2,141			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 10.** Análise de variância (ANOVA) para a atividade de glucanases (Absorbância a 600nm/mg de Proteína) avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI) no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e não inoculadas.

HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	10,498	2,677	0,128	14,9%
	Tratamento	1	26,794	6,834	0,023	
	Linhagem*Tratamento	1	1,655	0,422	0,528	
	Erro	12	3,921			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	12,611	1,803	0,204	22,2%
	Tratamento	1	153,058	21,887	0,001	
	Linhagem*Tratamento	1	0,151	0,022	0,886	
	Erro	12	6,993			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	28,449	53,793	0,000	6,5%
	Tratamento	1	131,728	249,083	0,000	
	Linhagem*Tratamento	1	6,706	12,681	0,004	
	Erro	12	0,529			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 11.** Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de germinação de conídios da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana.

HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	9,250	2,516	0,139	5,0%
	Tratamento	1	64,670	17,590	0,001	
	Linhagem*Tratamento	1	9,250	2,516	0,139	
	Erro	12	3,680			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	93,400	51,260	0,000	2,0%
	Tratamento	1	16,700	9,150	0,011	
	Linhagem*Tratamento	1	0,300	0,190	0,673	
	Erro	12	1,800			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	0,600	0,900	0,360	1,0%
	Tratamento	1	0,000	0,000	0,961	
	Linhagem*Tratamento	1	0,400	0,600	0,468	
	Erro	12	0,700			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 12.** Análise de variância (ANOVA) para a porcentagem de formação de apressórios da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), no primeiro trifólio de linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana.

HAI	Fonte de Variação*	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	2,242	12,543	0,004	14,7%
	Tratamento	1	9,792	54,785	0,000	
	Linhagem*Tratamento	1	0,448	2,509	0,139	
	Erro	12	0,179			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	0,053	0,021	0,888	30,9%
	Tratamento	1	6,343	2,480	0,141	
	Linhagem*Tratamento	1	1,879	0,735	0,408	
	Erro	12	2,558			
HAI	Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	0,205	0,091	0,769	20,4%
	Tratamento	1	1,975	0,874	0,368	
	Linhagem*Tratamento	1	22,356	9,890	0,009	
	Erro	12	2,260			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação. \*Dados transformados para  $\sqrt{x}$ .

**Anexo 13.** Análise de variância (ANOVA) para o número de células com reação de hipersensibilidade/cm<sup>2</sup>, avaliada 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI), em linhagem resistente e suscetível de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água ou ulvana e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

HAI	Fonte de Variação*	GL	QM	Fc	P	CV(%)
12	Linhagem	1	0,194	1,775	0,208	11,8%
	Tratamento	1	0,027	0,250	0,626	
	Linhagem*Tratamento	1	0,017	0,156	0,700	
	Erro	12	0,109			
HAI	Fonte de Variação*	GL	QM	Fc	P	CV(%)
24	Linhagem	1	2,430	26,825	0,000	10,3%
	Tratamento	1	0,732	8,083	0,015	
	Linhagem*Tratamento	1	0,168	1.854	0,198	
	Erro	12	0,091			
HAI	Fonte de Variação**	GL	QM	Fc	P	CV(%)
48	Linhagem	1	10,565	9,634	0,009	19,3%
	Tratamento	1	0,461	0,420	0,529	
	Linhagem*Tratamento	1	0,031	0,028	0,869	
	Erro	12	1,097			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de Fc>F esperado; CV(%): Coeficiente de variação. \*Dados transformados para Log(x). \*\*Dados transformados para  $\sqrt{x}$ .

**Anexo 14.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas no momento do preparo dos tratamentos (agosto de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose*					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	0,975	18,544	0,000	12,8
Erro	20	0,053			
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	248,220	17,069	0,000	17,0
Erro	20	14,540			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação. \*Dados transformados para  $\sqrt{x}$ .

**Anexo 15.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas no momento do preparo dos tratamentos (agosto de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose		
Tratamento	Média	Tukey
Sílica amorfa + Ulvana	2,8	A
Caulinita + Ulvana	2,1	A
Atapulgita + Ulvana	4,5	B
Ulvana	2,1	A
Água	5,3	B
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)		
Tratamento	Média	Tukey
Sílica amorfa + Ulvana	19,4	A
Caulinita + Ulvana	17,7	A
Atapulgita + Ulvana	27,7	B
Ulvana	16,5	A
Água	30,9	B

**Anexo 16.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas quatro meses após o preparo dos tratamentos (dezembro de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	9,453	6,323	0,001	27,8
Erro	20	1,495			
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	890,560	6,496	0,000	30,3
Erro	20	137,090			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 17.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas quatro meses após o preparo dos tratamentos (dezembro de 2008), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose		
Tratamento	Média	Tukey
Ulvana + Sílica amorfa	3,1	A
Ulvana + Caulinita	3,8	AB
Ulvana + Atapulgita	5,5	ABC
Ulvana	3,7	AB
Água	6,0	C
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)		
Tratamento	Média	Tukey
Ulvana + Sílica amorfa	28,5	A
Ulvana + Caulinita	30,4	A
Ulvana + Atapulgita	46,4	B
Ulvana	32,0	A
Água	56,5	B

**Anexo 18.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas oito meses após o preparo dos tratamentos (abril de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	6,510	11,889	0,000	15,5
Erro	20	0,548			
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	1084,690	13,806	0,000	22,5
Erro	20	78,560			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 19.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas oito meses após o preparo dos tratamentos (abril de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose		
Tratamento	Média	Tukey
Ulvana + Sílica amorfa	3,5	A
Ulvana + Caulinita	4,2	AB
Ulvana + Atapulgita	6,3	C
Ulvana	4,3	AB
Água	5,6	BC
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)		
Tratamento	Média	Tukey
Ulvana + Sílica amorfa	26,3	A
Ulvana + Caulinita	29,1	A
Ulvana + Atapulgita	53,8	B
Ulvana	31,0	A
Água	57,1	B

**Anexo 20.** Análise de variância (ANOVA) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas 12 meses após o preparo dos tratamentos (agosto de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	5,788	7,682	0,000	33,9
Erro	20	0,754			
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)					
Fonte de Variação	GL	QM	Fc	P	CV(%)
Tratamento	4	231,010	12,721	0,000	19,6
Erro	20	18,160			

GL: Graus de Liberdade; QM: Quadrado Médio; Fc: Valor do F-teste calculado; P: Probabilidade de  $F_c > F$  esperado; CV(%): Coeficiente de variação.

**Anexo 21.** Resultado do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para a Severidade da Antracnose e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), avaliadas avaliadas 12 meses após o preparo dos tratamentos (agosto de 2009), para plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. IPR Uirapuru tratadas com água, ulvana ou as formulações de ulvana com os inertes Caulinita, sílica amorfa e atapulgita (concentração final de ulvana = 10mg/mL) e inoculadas com a raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Severidade da antracnose		
Tratamento	Média	Tukey
Ulvana + Sílica amorfa	1,6	A
Ulvana + Caulinita	1,7	A
Ulvana + Atapulgita	3,3	B
Ulvana	2,2	A
Água	4,1	B
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)		
Tratamento	Média	Tukey
Ulvana + Sílica amorfa	16,0	A
Ulvana + Caulinita	16,6	A
Ulvana + Atapulgita	26,6	B
Ulvana	18,5	A
Água	31,3	B