

ANTONIA ALICE COSTA RODRIGUES

**RESISTÊNCIA DE CAUPI A *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*:
AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMAS, INDUÇÃO DE DEFESA E
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS, ESTRUTURAIS E
ANÁLISE DA CAPACIDADE FUNCIONAL DO XILEMA.**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Fitossanidade -
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Fitopatologia.

**RECIFE - PE
JANEIRO, 2003**

Catálogo na fonte
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

R696f. Rodrigues, Antonia Alice Costa
Resistência de caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*: avaliação de germoplasmas, indução de resistência, caracterização de mecanismos bioquímicos, estruturais e análise da capacidade funcional do xilema / Antonia Alice Costa Rodrigues.
125 p. : il.

Orientador: Rildo Sartori Barbosa Coelho
Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fitossanidade, 2003.
Bibliografia

CDD 581.2

1. Fitopatologia 2. *Fusarium* 3. *Vigna unguiculata* 4. Caupi 5. Indução
6. Resistência 7. Enzimas 8. Lignificação 9. Condução Hidráulica
I. Coelho, Rildo Sartori Barbosa
II. Título.

RESISTÊNCIA DE CAUPI A *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*:
AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMAS, INDUÇÃO DE DEFESA ,
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS, ESTRUTURAIS E
ANÁLISE DA CAPACIDADE FUNCIONAL DO XILEMA.

ANTONIA ALICE COSTA RODRIGUES

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em:

ORIENTADOR:

Profº Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho

EXAMINADORES:

Profª. Dra. Elvira Maria Regis Pedrosa

Profª. Dra. Rejane Pimentel

Profº Dr. Gilson Soares da Silva

Profº/Dr. Egídio Bezerra Neto

Profª. Dra. Luíza Suely S. Martins

RECIFE – PE
JANEIRO 2003

RESISTÊNCIA DE CAUPI A *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*:
AVALIAÇÃO DE GERMOPLASMAS, INDUÇÃO DE DEFESA,
CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS, ESTRUTURAIS E
ANÁLISE DA CAPACIDADE FUNCIONAL DO XILEMA.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO

Prof.º Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho – Orientador

Prof.ª Dra. Maria Menezes – Co-orientadora

Prof.º Dr. Egídio Bezerra Neto – Co-orientador

RECIFE - PE
JANEIRO, 2003

À memória de minha mãe

ANTONIA DE JESUS COSTA RODRIGUES

MINHA HOMENAGEM

*A toda minha família pelo apoio e compreensão
na ausência no convívio*

OFEREÇO

*Ao meu filho Erik Ronan, pelo amor, companheirismo e
pela compreensão na interferência dos seus planos de
vida, em prol de meus projetos pessoais.*

DEDICO

***“Espera no Senhor, anima-te, e ele fortalecerá o teu
coração; espera pois no Senhor.”***

(Salmo 27:14)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção constante em todos os momentos da minha vida;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Estadual do Maranhão, pelo apoio financeiro;

Ao professor Rildo Sartori Barbosa Coelho pelo incentivo, apoio, amizade e valiosíssima orientação durante a realização deste trabalho;

Ao professor Egídio Bezerra Neto pelo empenho, apoio, conhecimentos e experiências repassadas no desenvolvimento desta Tese e a todos os participantes do Laboratório de Bioquímica Vegetal pelo apoio e amizade;

À professora Cristina A. Peixoto, Fábila Cristiane M. L. de Lira e Elizângela Santos F. Dias pela cooperação, amizade e disponibilidade demonstradas;

À professora Rejane Pimentel pela colaboração e apoio imprescindível na realização deste trabalho e a Neewton Albuquerque e Graça Chagas pela convivência saudável no Laboratório;

À professora Maria Menezes pelo apoio, amizade e carinho demonstrados à minha pessoa.

A Eduardo Mendes e Samuel Batista do Laboratório de Controle Biológico de IPA, pela amizade e colaboração na condução dos experimentos.

Ao Prof. Gilson Soares da Silva pela amizade e incentivo e confiança demonstrados.

A todos os professores do Curso de Doutorado pela amizade, ensinamentos e constante estímulo.

Aos amigos Adriana, André, Angélica, Arlinda, Domingos, Genira, Suerda, Gaus e Suzana pela amizade e convívio carinhoso durante essa jornada.

A todos os colegas de turma do Doutorado em Fitopatologia pela convivência agradável.

SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS	vii
SUMÁRIO	viii
RESUMO	X
ABSTRACT	Xii
Capítulo I- Introdução Geral	15
Resistência de Cultivares de Caupi a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	17
Indução de Resistência	19
Mecanismos de Resistência	25
- Mecanismos bioquímicos	26
- Mecanismos estruturais	31
Referências Bibliográficas	34
Capítulo II - Murcha de fusário do caupi: reação de germoplasma, métodos de inoculação e controle genético da resistência.	52
Resumo	52
Abstract	54
Material e Métodos	58
Resultados e Discussão	62
Referências Bibliográficas	71
Capítulo III Indução de resistência a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada.	78
Resumo	78
Abstract	79
Introdução	80

Material e Métodos	83
Resultados e Discussão	87
Referências Bibliográficas	96
Capítulo IV. Mecanismos estruturais e análise funcional do xilema envolvidos na ativação de respostas de defesa de caupi [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> .	108
Resumo	108
Abstract	109
Introdução	109
Material e Métodos	111
Resultados e Discussão	112
Referências Bibliográficas	118
Considerações Gerais	123

RESUMO

O caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma cultura de grande expressão econômica, principalmente no Norte e Nordeste do Brasil. Possui como um dos fatores limitantes de cultivo, a ocorrência de doenças como a murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Snyder & Hansen, tendo como principal medida de controle o uso de cultivares resistentes. No presente estudo, foi verificada a resistência de 30 germoplasmas de caupi ao isolado ISO-PE de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, o efeito dos métodos de inoculação tipo *deeping* e ferimento em raízes da cultivar BR-17 Gurguéia e avaliada a herança da resistência em uma população F₂ de 386 indivíduos resultante do cruzamento entre L-288004 e BR-17 Gurguéia. As inoculações foram realizadas em plantas com sete dias de idade, com deposição de suspensão de 1×10^6 conídios.mL⁻¹, em um dos lados do sistema radicular, após ferimentos. No método *deeping*, as plantas cultivadas em vermiculita tiveram 1,0 cm das extremidades das raízes cortadas, imersas em suspensão de conídios por cinco minutos e plantadas em vaso com solo esterilizado. A avaliação foi realizada aos 25 dias após germinação, com base em escala de notas, índice de doença e percentagem de lesão. Foram verificados, ainda, o efeito dos indutores ESM, BABA e quitosana nas cultivares de caupi IPA-206 e BR-17 Gurguéia, aplicados aos cinco dias após germinação e inoculadas com suspensão de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ do ISO-PE, avaliado quanto a severidade e controle da doença, aos 25 dias após germinação, através de escala de notas e índice de doença. O efeito desses indutores, também, foi observado através da atividade enzimática de β -1,3-

glucanase, peroxidase e fenilalanina amônia liase, aos cinco e 10 dias após a inoculação do patógeno. Através da análise histológica de cortes das raízes das cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, induzidas e inoculadas com o patógeno, seguindo a metodologia anterior, foi verificado o efeito desses indutores na lignificação do xilema, como mecanismo estrutural de resistência e na capacidade de condução de água pelos xilemas nas plantas, avaliada aos 17 e 25 dias após germinação. Dos 30 germoplasmas avaliados, metade apresentaram resistência ao patógeno, destacando-se as linhagens L-288004 e L-190004. Os métodos de inoculação tipo *deeping* e ferimento em raízes induziram os mesmos tipos de sintomas, embora, o método *deeping* tenha proporcionado sintomas com maior rapidez. Na análise da herança da resistência foi encontrada uma frequência de 13 plantas resistentes para 3 suscetíveis, indicando segregação de dois genes independentes, um deles com efeito epistático dominante. Dentre os indutores testados, ESM proporcionou controle da doença de 68,90 e 71,59 % nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, respectivamente. Em relação à atividade enzimática, o indutor ESM apresentou melhores resultados nas atividades de β -1,3-glucanase, peroxidase e PAL na cultivar IPA-206, aos cinco e 10 dias. Os indutores BABA e quitosana diferiram da testemunha, na atividade de PAL e β -1,3-glucanase, respectivamente, na cultivar IPA-206. Quanto ao aspecto estrutural, o indutor quitosana proporcionou deposição de lignina no xilema das duas cultivares testadas, quando analisado aos 17 e 25 dias após germinação. O indutor ESM, quando aplicado na cultivar BR-17 Gurguéia, proporcionou maior condutância hidráulica, em relação à testemunha, indicando que o indutor não interferiu no metabolismo das plantas induzidas.

ABSTRACT

Cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. is a high economic outcome crop, mainly in North and Northeast regions of Brazil. One of limiting factors of crop is, the occurrence of diseases like Fusarium wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Snyder & Hansen, which demands the use of resistant cultivars as the main measure of control. The resistance of 30 cowpea germ plasms of to the ISO-PE isolate *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, the effect of the inoculation methods deeping and root cutting on the cultivar BR-17 Gurguéia, and the resistance heritage in a F₂ population, composed of 386 individuals resulted from L-288004 and BR-17 Gurguéia cross were evaluated. Seven days old plants were inoculated with a conidia suspension, adjusted to concentration of 1×10^6 conidia mL⁻¹, in a side of the root system, after wound had been made on the plants. For the deeping method, plants cultivated in vermiculite, were removed and the roots immersed in a conidia suspension for five minutes, then they were planted in a pot containing esterilized soil. Assessment was carried out 25 days after germination, based on grade scale, disease intensity and severity. Moreover, the effect of the inducers ESM, BABA and Chitosan was verified on IPA-206 and BR-17 Gurguéia, which were applied to the soil five days after germination and inoculated with a 1×10^6 conidia.mL⁻¹ suspension of ISO-PE isolate, and evaluated through severity and disease control, 25 days after germination, by the grade scale and disease intensity. In addition, the effect of these inducers was compared through β -1,3 glucanase, peroxidase and phenilalanina ammonium liase enzyme activity, at five and 10 days after inoculation of the pathogen. By tissue analysis from root cuttings of BR-17 Gurgueia and IPA-206, induced and inoculated with the pathogen, following the

methodology above, it was observed the effect of these inducers on lignification of the xylem as resistance structural mechanism and capacity of water conduction by the plant xylem, assessed at 17 and 25 days after germination. Half of the 30 evaluated germ plasms showed resistance to the pathogen, mainly L-288004 and L-190004 lines. Inoculation methods, deeping and wounds on roots, led to the same symptoms, although deeping method provided sooner symptoms. In the analysis of resistance heritage et was found frequency of 13 resistant to 3 susceptible plants, what pointed out a segregation of two independent genes, a recessive and a dominante one. Among the inducers, ESM provided 68,90 % and 71,59 % disease control for BR-17 Gurguéia and IPA-106, respectively. The enzyme activity, ESM revealed better results for β -1,3 glucanase, peroxidase and PAL on IPA-206 cultivar, at five and 10 days. BABA and chitosan differed from the control, for the PAL and β -1,3 glucanase, respectively, on IPA-206. For the structural aspect, chitosan provided deposition of lignin inside xylem of both cultivars, at 17 and 25 days after germination. ESM applied to BR-17 Gurguéia induced higher water conduction when compared to the control, suggesting that the inducer did not interfere on metabolism of the induced plants.

INTRODUÇÃO GERAL



INTRODUÇÃO GERAL

A cultura do caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], família Fabaceae, possui importância econômica expressiva em regiões tropicais e subtropicais, com ampla distribuição mundial. É originária da África e teve como centro de domesticação a parte norte do continente, comprovada, recentemente, através de estudo genético (Bezerra, 1997; Coulibaly *et al.*, 2002). No Brasil, a maior concentração de cultivo do caupi se encontra nas regiões Norte e Nordeste, como cultura de subsistência, geralmente, em pequenas unidades produtivas, em consórcio ou como monocultura em sequeiro ou em cultivos comerciais irrigados (Cardoso *et al.*, 2000; Andrade Júnior *et al.*, 2000).

Contudo, o caupi possui algumas características inerentes, como alto valor protéico; ótima capacidade de fixação de nitrogênio através da simbiose com rizóbios, mesmo em solos com baixa fertilidade; capacidade de adaptação a diferentes condições de clima e solo; além de possuir tolerância moderada à salinidade, devido a rusticidade e precocidade (Melo & Cardoso, 2000; Dantas *et al.*, 2001). O grão é um importante componente na dieta alimentar, rico em proteínas, aminoácidos, minerais, vitaminas e carboidratos, obedece aos padrões estabelecidos pela Organização Mundial para a Agricultura e Alimentação (FAO), que determina os teores de nutrientes necessários para que um vegetal seja destinado ao consumo humano, pode, também, ser aproveitado na alimentação animal, na forma de forragens (Oluwatosin, 1997; Hussain & Basahy, 1998; Tuan *et al.*, 1999).

No âmbito mundial, as estimativas da FAO indicam uma produção de mais de 3 milhões de toneladas/ano, com uma área estimada em 12,5 milhões de hectares, das quais 8 milhões estão na África (CGIAR, 2000). No Brasil, a área destinada para essa cultura é em torno de 1.451.578 hectares, a qual produz mais de um milhão de empregos diretos e movimenta cerca de U\$ 249.142.582,00/ano (Corrêa, 2001). Considerando, ainda, as safras de 1995 a 2000 no Brasil, a área colhida com caupi correspondeu a 26,4 %, em relação ao feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), concentrada nas regiões Norte e Nordeste. As instabilidade climática e pluviométrica desta última região são refletidas na produção, com grandes oscilações, como, por exemplo, na safra 1999/2000 a produção de caupi foi de 666,6 mil toneladas, enquanto que na safra de 1997/1998 foi de apenas 87,9 mil toneladas (Pereira *et al.*, 2001). No Estado de Pernambuco, a produção de feijão, em 2001, correspondeu a 46.976 toneladas, incluindo os gêneros *Vigna* e *Phaseolus* (IBGE, 2001).

O baixo rendimento é, muitas vezes, atribuído a problemas fitossanitários, tornando-se um dos fatores limitantes dessa cultura, dentre os quais, a murcha de fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) Snyder & Hansen, é uma das principais doenças, responsável por perdas consideráveis (Rios, 1988; Cardoso, 1990).

Essa doença foi relatada inicialmente nos Estados Unidos (Kendrik, 1931), sendo constatada mais tarde em outras regiões do mundo, como Canadá, Colômbia, Índia, Austrália, África Central (Holliday, 1970), Nigéria (Oyekan, 1975) e Brasil (Rios, 1988). A ocorrência é mais freqüente em regiões secas com altas temperaturas (Abawi & Pastor Corrales, 1990). Os sintomas mais comumente observados, consistem na redução do crescimento das plantas, clorose, murcha e queda prematura das folhas, resultando na morte das plantas infectadas (Athayde Sobrinho *et al.*, 2000).

O programa de controle da doença é realizado através da integração de várias técnicas, como escolha de local, época de plantio, tratamento de sementes e utilização de cultivares resistentes, sendo este último método, um dos meios mais eficazes no controle da murcha de fusário (Rios, 1988).

Resistência de cultivares de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

A capacidade que uma planta possui em atrasar ou evitar a atividade de um determinado patógeno é caracterizada como resistência. A introdução de cultivares contendo novos genes para resistência a doenças tem sido um marco na agricultura moderna. A adoção desta técnica requer alguns requisitos básicos a serem considerados, tais como o conhecimento da fonte de resistência genética, o método de identificação e seleção da resistência, combinada com características agronômicas das cultivares (Lucas, 1998) e variabilidade do patógeno, que é essencial na estabilidade e durabilidade da resistência (Camargo, 1997).

A primeira referência, em relação a resistência de cultivares de caupi, ocorreu na Carolina do Sul, sendo a cultivar Iron, a primeira indicação de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Rigert & Foster, 1987). Alguns programas de melhoramento de cultivares de caupi foram implementados, porém, estes trabalhos limitaram-se aos Estados Unidos e Nigéria, como aqueles desenvolvidos pela Universidade da Carolina do Sul, responsável pelo lançamento de várias cultivares, denominadas Califórnia Blackeye, que servem de base para cruzamentos e lançamentos de novas cultivares com resistência ao patógeno (Ehlers, 2001). O patógeno, por sua vez, através de processos evolutivos, se adapta à nova cultivar, ocasionando o surgimento de novas raças. Até então, são conhecidas

quatro raças de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, sendo que as raças 1 e 2 foram relatadas na Carolina do Sul e as raças 3 e 4 na Califórnia (Armstrong & Armstrong, 1950; 1980; Rigert & Foster, 1987; Ehlers, 2001).

Armstrong & Armstrong (1950) avaliaram, simultaneamente, 17 cultivares de caupi a vários isolados de *Fusarium* e verificaram que a cultivar Iron apresentou resistência às raças 1 e 2, Lady Finger comportou-se como resistente apenas à raça 2 e as cultivares Califórnia Blackeye-5, Ramshors, Whippoorwill e Rice apresentaram resistência à raça 1. Mais tarde, Armstrong & Armstrong, (1980), através do uso de cultivares diferenciadoras, caracterizaram os isolados testados com pertencentes às raças 1, 2 e 3 e avaliaram 20 cultivares de caupi, encontrando fontes de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* nas cultivares Magnolia, Iron PI 293520, Iron TVU 990, Iron TVU 1072 e Iron TVU 1611 para as três raças. Na Nigéria, Fawole (1989) confirmou a resistência da cultivar TVX 347 ao patógeno, porém, não especificou a raça utilizada.

Um dos primeiros estudos sobre herança da resistência foi realizado por Hare (1957), baseado no cruzamento da cultivar Iron, resistente às raças 1, 2 e 3, com as cultivares Extra Early Blackeye, Purple Hull Bunch e Mississippi Crowder, resistentes à raça 1 e suscetíveis às raças 2 e 3, sendo sugerido que a resistência às raças 2 e 3 é controlada por dois genes dominantes. No entanto, para as cultivares Califórnia Blackeye (CB3) e a linhagem 7964, a resistência é conferida por um único gene de co-dominância incompleta para a raça 2 e um único gene de dominância completa para a raça 3 (Rigert & Foster, 1987).

Indução de Resistência

A resistência a doenças de plantas está associada com a ativação de ampla variedade de respostas de defesa, que tem como finalidade impedir o estabelecimento de patógenos. A ocorrência de doença é devido à falha do hospedeiro no reconhecimento do patógeno, em responder rapidamente a esse sinal ou falha nos mecanismos físicos ou químicos em prevenir a infecção (Lyon & Newton, 1997).

O reconhecimento do patógeno e a ativação das respostas de defesa são reguladas em uma interação específica gene-a-gene, direta ou indireta, entre os produtos do gene de resistência do hospedeiro e do gene de avirulência do patógeno, que raramente ocorre, levando as plantas a apresentarem, com frequência, reação de suscetibilidade em muitas interações (Klessing *et al.*, 2000). No entanto, cultivares suscetíveis ou com baixo nível de resistência podem apresentar respostas de defesa em uma interação não específica, através de indução de resistência, desenvolvendo os mesmos mecanismos de defesa que ocorrem em uma interação incompatível (Ryals *et al.*, 1996; Lyon & Newton, 1997).

A indução de resistência recebeu maior ênfase a partir da década de 60, através do uso de indutores bióticos com proteção cruzada viral e uso de microrganismos não patogênicos e, mais recentemente, com o uso de indutores sintéticos, efetivos contra vírus, bactérias e fungos, sendo caracterizada como resistência sistêmica adquirida (RSA). Essa resistência refere-se a uma rota de transdução de sinal distinta, que desempenha importante papel na habilidade das plantas se defenderem contra patógenos (Ryals *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996).

Vários fenômenos da resistência induzida estão associados com o aumento da capacidade de uma rápida e efetiva ativação de resposta de defesa celular, induzida após

contato com o patógeno (Conrath *et al.*, 2002; Kohler *et al.*, 2002). A rota de transdução de sinal da RSA tem a função de potencializar os mecanismos de defesa, através da expressão de genes associados com a RSA, que pode ser relacionado com a reação de hipersensibilidade. Esta tem como finalidade o confinamento do patógeno no sítio de infecção, através da morte de células ou região do tecido, formação de barreiras estruturais como lignificação, deposição de calose, compostos fenólicos, através da participação de enzimas chave como fenilalanina amônia liase e peroxidase, ou ainda, explosão oxidativa e ativação coordenada de genes de defesa, em locais distante do ponto de infecção, como a síntese das PR-proteínas β -1,3-glucanase e quitinase (Delaney, 1997; Gilchrist, 1998; Conrath *et al.*, 2002).

Na indução de resistência com indutores abióticos, a ação desses agentes não é devido à atividade antimicrobiana, mas à capacidade de indução de resistência e manutenção da proteção a partir da aplicação, até que seja completamente expressa (Kúc, 2001). Vários indutores são relacionados com a ativação de resistência, destacando-se éster-S-metil (ESM) do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotiótico (Cole, 1999), ácido DL-3-amino-n-butírico (ácido β -aminobutírico – BABA) (Jakab *et al.*, 2001) e quitosana (Benhamou & Bélanger, 1998), todos atuando em diferentes pontos da rota do ácido salicílico, relacionados com os mecanismos de defesa (Jakab *et al.*, 2001).

Estudos recentes têm indicado que o ESM é um ativador em potencial da RSA em vários hospedeiros, em condições de campo, contra um amplo número de patógenos, através da indução da produção de ácido salicílico, mesmo em plantas incapazes de

produzir em tal molécula, ativando assim o sistema de defesa (Görlach *et al.*, 1996; Benhamou & Bélanger, 1998; Resende *et al.*, 2000).

O ESM é translocado por toda a planta e é ativador da transdução de sinal da RSA, em local fora ou no mesmo sítio de acumulação de ácido salicílico, agindo na indução de genes que desencadeiam a produção de lignina, fitoalexinas e PR-proteínas (Friedrich *et al.*, 1996; Cavalcanti, 2000). É análogo do ácido salicílico e do ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), possui molécula semelhante (Figura 1A), pertence à classe química dos benzothiadiazole, caracterizando-se como um agente protetor de planta, seguro, confiável e não fitotóxico (Görlach *et al.*, 1996; Benhamou & Bélanger, 1998).

A aplicação de ESM pode ser efetuada em folhas e sementes, induzindo reação de resistência em vários hospedeiros. A reação sistêmica foi induzida em feijoeiro comum contra *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br & Cav. e *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger, com aplicação direta do produto nas folhas, e através de tratamento de sementes, contra *Rhizoctonia solani* Kühn, reduzindo a severidade das doenças (Siegrist *et al.*, 1997). Dann *et al.* (1998) observaram que cultivares de soja (*Glycine max* Merrill) suscetíveis a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, quando tratadas com ESM, em condições de campo, apresentaram redução de severidade da doença de 20 a 60 %. A redução de lesões causadas por *Hemileia vastatrix* Berk et Br. foi considerável em plantas de café (Coffea arabica L.) em concentrações de ESM variando de 10 a 400 ppm, induzindo proteção local de 66 a 97 % e sistêmica de 83 a 94 %, persistindo até 10 semanas, revelando potencial de uso prático no manejo de ferrugem do café (Guzzo *et al.*, 2001).

Em caupi, o ESM apresentou ativação da resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, com aplicações de dosagens de 2,5 e 5,0 g do i.a./100 L de água, aos cinco e sete dias após germinação da cultivar IPA-206, apresentando índices de doença de 40,11 e 47,09 % nas respectivas dosagens (Rodrigues & Coelho, 2002). A efetividade, também, foi constatada contra *Colletotrichum destructivum* O' Gara, causador da antracnose, em plântulas de caupi (Latunde-Dada & Lucas, 2001).

O ácido β -aminobutírico, considerado como um novo indutor de resistência, tem sido testado contra vários patossistemas. É um aminoácido não protéico, de ocorrência rara na natureza (Figura 1B), que age desencadeando o processo de formação de PR-proteínas, envolvidos na defesa de plantas a patógenos (Jakab *et al.*, 2001).

Cohen (1993) observou que BABA não possui atividade antifúngica *in vitro*, mas induziu proteção local e sistêmica em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. O mesmo tipo de proteção foi constatado em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) contra *Peronospora tabacina* Adam, através da prevenção da colonização fúngica, reduzindo esporulação e expressão de sintomas, embora o mecanismo de ação não tenha sido esclarecido (Cohen, 1994). O mesmo autor verificou, ainda, que dosagens de BABA acima de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, provocou toxicidade em plantas de fumo.

Zimmerli *et al.* (2000) analisaram o modo de ação de BABA em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, quando inoculado com *Peronospora parasitica* (Person) Fries e observaram que na resistência sistêmica adquirida estão envolvidos vários mecanismos de defesa, dependendo da concentração do indutor. Em baixas concentrações, ocorre um

espectro de respostas imitando reação de hipersensibilidade com vestígios de necroses, sendo que a intensidade dessas respostas depende da concentração interna de BABA. Em altas concentrações de BABA, ocorre deposição de calose ou papilas, sempre após a penetração do patógeno, na tentativa de contê-lo no sítio de infecção. Nesse caso, a indução de resistência ocorreu pela aceleração das respostas normais de infecção na planta, conduzindo, também, a um alto nível de resistência, sendo este fenômeno conhecido como potencialização celular.

O tratamento do solo com BABA foi efetivo contra *Botrytis cinerea* Pers. & Fr. causador do mofo cinzento em *Arabidopsis*, reduzindo a superfície da área necrosada, três dias após inoculação, embora o processo infeccioso não tenha sido completamente impedido pelo indutor, a incidência da doença foi reduzida, formando pequenas lesões, quando comparada à testemunha (Zimmerli *et al.*, 2001). Porém, os autores sugerem que o fato de BABA não ter induzido resposta de resistência sistêmica mais efetiva, pode ser decorrência da ação desse indutor fora da rota do ácido salicílico, ou devido a reconhecimento defeituoso, incorrendo em demora na expressão dos genes PR-1. Por outro lado, a defesa efetiva pode depender, em grande parte, de outra rota metabólica envolvendo jasmonato/etileno, que é independente da rota do ácido salicílico.

Quitosana é um oligossacarídeo bioativo, derivado de quitina que ocorre na parede celular de vários fungos e é extraído da quitina de crustáceos, cuja unidade monomérica é o 2-amino-2-deoxy-D-glucosamina (Figura 1C) que combinado com 1-4 glucosídico forma uma cadeia linear (Benhamou *et al.*, 1998).

O uso de quitosana como indutor desperta grande interesse devido a dupla função que possui, exercendo efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos, além de

ser um elicitor potente que ativa os mecanismos de defesa das plantas (El Ghaouth *et al.*, 1994).

Benhamou (1992) observou que quitosana inibiu o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker causando expansão e distorção da hifa e estimulando a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase, além de induzir deposições anormais de material amorfo na parede celular de tomateiro. A ação desse indutor foi confirmada, ainda, através do tratamento de sementes, reduzindo a severidade da podridão radicular do tomateiro (Benhamou *et al.*, 1994), assim como na podridão de raízes de pepino (*Cucumis sativus* L.) causada por *Pythium aphanidermatum* Edson (Fritz.), onde plantas tratadas com 400 μ g/mL do produto, permaneceram sadias e com o sistema radicular bem desenvolvido, enquanto a testemunha na presença do patógeno expressou sintomas de murcha após 24 horas, em cultivo hidropônico (El Ghaouth *et al.*, 1994).

A evidência do desencadeamento da RSA por quitosana foi observada de uma forma abrangente em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) contra *Puccinia arachidis* Speg, através da ação direta sobre o patógeno, inibindo a germinação de uredosporos, o número e o tamanho de lesões e, conseqüentemente, a severidade da doença. Foram observados aumento da produção de ácido salicílico endógeno e ação das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase (Sathiyabama & Blasubramanian, 1998).

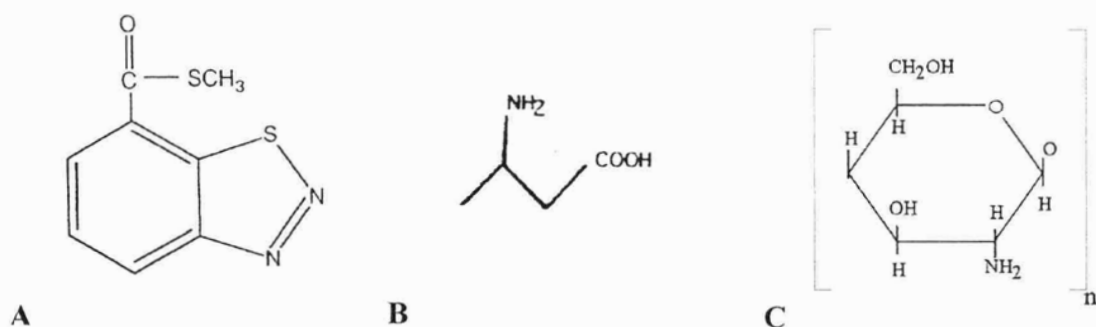


Figura 1. Estrutura química dos indutores abióticos: ESM (A); BABA (B) e quitosana (C).

Mecanismos de Resistência

Alterações significativas no desenvolvimento bioquímico e fisiológico normal de uma planta caracteriza o processo de doença. Essas alterações podem ser causadas por fatores abióticos ou bióticos, sendo estes denominados patógenos, que possuem afinidade com determinadas partes do hospedeiro, necessitando de aberturas naturais, ferimento ou penetrando diretamente através de ação enzimática, força física, ou ambas. O mesmo envolvimento enzimático que serve para viabilizar a penetração e colonização, também pode liberar fragmentos da parede celular dos fungos (oligossacarídeos solúveis) que podem ser tóxicos às plantas ou elicitarem resposta de defesa das mesmas (Funell 2000).

As plantas possuem como estratégias de defesa, barreiras estruturais que evitam que o patógeno obtenha alimento do hospedeiro, ou defesa enzimática e química que interferem no metabolismo do patógeno. Em decorrência da ação enzimática podem ocorrer

síntese de metabólitos secundários antimicrobiano, espécies de oxigênio reativo, lignificação da parede celular do hospedeiro e ativação de grande número de genes, que codificam glucanases, quitinases, thioninas, defensins, glutathione S transferase, fenilalanina amônia liase, além de enzimas do metabolismo secundário (Hammond-Kosac & Jones, 1996; Glazebrook, *et al.*, 1997).

Os mecanismos de resistência geralmente são divididos em pré e pós-formados, sendo que estes são produzidos ou ativados em resposta à presença dos patógenos e exercem papel destacado no processo de resistência, uma vez que a amplitude de compostos existentes nas plantas superiores permite ações diferenciadas sobre os microrganismos. No entanto, quando as cultivares não apresentam os mecanismos de defesa constitutivos, estes podem ser ativados por indutores, após subsequente ataque de patógenos, caracterizando a RSA (Sticher *et al.*, 1997).

Mecanismos bioquímicos

A RSA pode ser distinta de outras respostas de resistência a doenças pelo espectro de proteção a patógenos e pela expressão de genes associados a mudanças, através de uma rota de transdução de sinais que induzem as próprias plantas a se defenderem (Ryals *et al.*, 1996).

Foram realizadas várias tentativas de explicação da transdução de sinais em uma interação incompatível, iniciando após a interação elicitor/receptor. Para Métraux (2001), após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, ocorre uma cascata de eventos. Dependendo do tipo de interação, ocorrem rotas específicas complexas no caso de patógeno virulento e rizobactérias interagindo com o hospedeiro, envolvendo o ácido jasmônico e

etileno. Em interações com patógenos avirulentos, duas classes de genes de resistência são envolvidos, desencadeando a ação do gene DND (*disease no death*), envolvido na reação de hipersensibilidade. Porém, independente da rota, é clara a importância do ácido salicílico como mensageiro secundário na transdução de sinais, que por sua vez, ativa o gene chave NPR1, envolvido na transcrição de genes responsáveis pela formação de PR-proteínas.

Dentre as respostas do hospedeiro, encontram-se as proteínas solúveis que são formadas nos fluídos intercelulares de tecidos infectados ou acumula-se intracelularmente, e pode ocorrer de forma constitutiva, em baixas concentrações. Porém, podem aumentar significativamente quando induzidas, sendo denominadas de proteínas relacionadas com a patogenicidade, agrupadas em famílias denominadas PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-2, PR-N, PR-O, PR-P, PR-Q e PR-S (Kaufman *et al.*, 1987; Fernandes, 1998).

Em uma definição mais atualizada, as PR-proteínas são consideradas proteínas de plantas que se acumulam após ataque de patógenos, tratamento com indutores químicos ou outro tipo de estresse, destas vários grupos apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo que quitinase e β -1,3-glucanase apresentam atividade antifúngica sinérgica (Mauch *et al.*, 1988; Sticher *et al.*, 1997).

A biossíntese do ácido salicílico ocorre pela conversão da fenilalanina para ácido trans-cinâmico, que pode seguir a via do ácido benzoico, que após a ação da enzima ácido-2-hidroxilase, se converte em ácido salicílico, ou pode seguir uma outra rota, a da hidroxilação do cinamato em ácido-2-cumárico, sendo oxidado a ácido salicílico (Ryals *et al.*, 1996; Fernandes, 1998).

De acordo com Bol *et al.* (1990), as quitinases e β -1,3-glucanases são enzimas constitutivas que ocorrem nas plantas e hidrolizam a quitina (um polímero de N-acetilglucosamina) e β -1,3-glucana, respectivamente. Possuem função imediata na defesa, pela ação direta sobre o patógeno e como elicitores ativando outros mecanismos locais ou sistêmicos na defesa das plantas.

Na família PR-2, as β -1,3-glucanases (β -Glu) existem como isoforma estrutural múltipla que diferem em tamanho, ponto isoeletrico, estrutura primária, localização celular e padrão de regulação (Leubner-Melzger & Meins Jr., 1999).

A atividade de β -1,3-glucanase foi observada em folhas de ervilha tratadas com 100 μ g i.a./mL de ESM (BTH) e inoculadas com *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & Blox) Stone. Após seis dias, a quantidade de enzima foi similar nas folhas inferiores e superiores das plantas, correspondendo a 13,45 e 14,87 Δ Abs₆₁₀ min⁻¹.mg.⁻¹, respectivamente. Tem sido bastante relatado aumento dessa PR-proteína associado à redução da severidade, embora, as rotas que essas enzimas agem na ativação de defesa ainda não tenham sido totalmente esclarecidas (Dann & Deverall, 2000).

Além da determinação quantitativa de β -1,3-glucanase, observações citoquímicas através de marcação com ouro coloidal, também demonstraram claramente a presença e localização de acumulação massiva dessa enzima na célula hospedeira. Benhamou *et al.* (1994) constatarem a formação de β -1,3-glucanase através de análise ultraestrutural em raízes de tomateiro tratadas com quitosana e inoculadas com *Fusarium*. Além dessa enzima, foi formada uma camada de compostos fenólicos que inibe diretamente o crescimento do fungo, criando um ambiente fitotóxico, sendo, em seguida, formada uma

camada de β -1,3-glucana, em área não infectada pelo patógeno e que funciona como uma segunda barreira contra o patógeno.

O aumento da atividade de β -1,3-glucanase foi constatado em várias plantas, principalmente em feijoeiro comum e caupi, após indução, com químicos ou organismos não patogênicos, reduzindo a severidade de doenças causadas por vários patógenos (Dann *et al.*, 1996; Siegrist *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2001).

As peroxidases são comuns em plantas e o aumento freqüente dessa enzima, como resposta ataques de patógenos, indica envolvimento no mecanismo de defesa, desempenhando importante papel no processo fisiológico, incluindo catabolismo das auxinas, modificações das propriedades da parede celular e lignificação (Wyatt *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2002). São classificadas de acordo com o ponto isoelétrico e massa molecular, apresentam grande variação, dependendo do tecido foliar e do local que a enzima se encontra (Fernandes, 1998). Siegrist *et al.* (1997) detectaram atividade de peroxidase nos fluídos intercelulares de folhas de feijão, agindo contra patógenos que se desenvolvem no apoplasto da célula.

O envolvimento da peroxidase na defesa foi constatado pelo aumento em plantas induzidas e inoculadas com o patógeno, comparado com as plantas controle. Cavalcanti (2000) observou o acréscimo na atividade dessa enzima em cacau (*Theobroma cacao* L.) contra *Verticillium dahliae* Kleb induzidas com ESM, 15 dias após inoculação do patógeno, permanecendo por longo tempo, além de rápido desenvolvimento da atividade. No mesmo hospedeiro, ESM proporcionou a indução da atividade dessa enzima 15 dias após o tratamento, indicando que pode ter ocorrido um aumento das formas constitutivas de

peroxidases ou mesmo o surgimento de formas induzidas após o tratamento (Resende *et al.*, 2000). Além de indutores químicos, organismos não patogênicos também podem induzir a atividade de peroxidases, tanto local (Dann & Deverall, 2000) quanto sistêmica (Xue *et al.*, 1998).

No mecanismo de defesa das plantas, as peroxidases atuam no processo de lignificação da parede celular, participando na conversão do álcool cinâmico em formas de radicais livres com o consumo do peróxido de hidrogênio, caracterizando o último passo na formação da lignina, embora, para alguns autores esse mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (Heldt, 1997; Fernandes, 1998; Oliveira *et al.*, 2001).

Fenilalanina amônia liase (PAL) é a primeira enzima a participar da rota biossintética dos fenilpropanóides, a qual é envolvida na síntese de compostos antimicrobianos, com baixo peso molecular, como as fitoalexinas, além de flavonóides e lignina pela conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico, catalizada pela PAL (Nakazawa *et al.*, 2001; Klessig *et al.*, 2000).

A resposta de defesa de plântulas de caupi contra *C. destructivum*, após a indução com ESM, envolveu a atividade de PAL antes de 24 horas e essa rápida indução foi relacionada com a resistência sistêmica adquirida (Latunde-Dada & Lucas, 2001). Souza *et al.* (2001), também, observaram atividade da PAL em frutos de pêssego *Prunus persica* (L.) Batsch, tratados com cloreto de cálcio e inoculados com *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. A expressão de genes que codificam a PAL é regulada em resposta a vários estímulos e desenvolvimento da planta (Imura *et al.*, 2002).

Mecanismos Estruturais

As defesas estruturais pós-infeccionais ou pós-formadas envolvem a formação e alterações em nível tissular, constituindo-se uma barreira que interfere no progresso dos fitopatógenos nas plantas, que podem ser agrupados em estruturas de defesa celular, como agregação citoplasmática, halos, papila, lignificação e, estruturas de defesa histológica, como camada de cortiça (súber), camada de abscisão e tiloses (Pascholati & Leite, 1994; Agrios, 1997).

A mudança na parede celular é uma das primeiras respostas da planta à invasão de fungos. A parede celular epidermal ao redor da papila, em folhas, forma halo- ou zonações, enquanto que raízes infectadas apresentam protusões características, conhecidas como lignificação (Lucas, 1998).

De acordo com Pascholati & Leite (1994), a principal função da lignificação é o estabelecimento de barreira mecânica contra o avanço do patógeno impedindo o ataque de enzimas hidrolíticas e a difusão de toxinas. A indução de lignificação tem sido relacionada com respostas de defesa em várias interações, inclusive, com hospedeiros suscetíveis, na tentativa de conter a infecção patogênica (Sticher *et al.*, 1997).

A biossíntese da lignina é constituída de uma rota longa que envolve várias etapas, iniciando com a conversão da fenilalanina em ácido transcinâmico, catalizada pela PAL, que é hidroxilado para formar o ácido p-coumárico. A partir desse ponto, ocorrem sucessivas hidroxilações e metilações, formando os ácidos caféico, ferúlico e sinápico, que são convertidos para seus respectivos ésteres Co-enzima A, pela enzima ácido cinamato A-ligase, ocorrendo redução para aldeídos e depois para álcoois pela cinamayl-CoA-oxiredutase e álcool cinamyl deidrogenase. Para vários autores, após a formação dos

álcoois fenilpropanóides (sinaphil, cumaril e coniferil), ocorre a oxidação pela peroxidase/hidróxido de hidrogênio e os radicais livres condensam-se em um processo denominado lignificação (Vance *et al.*, 1980; Heldt, 1997; Fernandes, 1998).

Xuei *et al.* (1988) analisaram folhas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. & Halst, e observaram que em 96 horas o *peg* de penetração foi encaixado em uma papila subjacente de material agregado de calose, porém, análises ultraestruturais demonstraram que as reações de defesa do hospedeiro iniciaram 24 horas após a inoculação do patógeno.

Isolado de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* inoculado em mudas de tomateiro resistente penetrou em várias células da epiderme próximas ao foco de infecção, localizando-se nos espaços intercelulares do córtex, contudo, teve o crescimento limitado nas camadas mais externas, não ocorrendo colonização nas camadas corticais internas do córtex, devido a acumulação de citoplasma sobre a parede adjacente à hifa fúngica, formando uma barreira defensiva estrutural contendo compostos fenólicos (Brammal & Higgins, 1988). O mesmo foi detectado por Benhamou & Bélanger (1998), quando a resistência das plantas de tomateiro foi induzida por ESM.

Um aspecto relevante quanto ao movimento da água no interior das plantas, reside nas características celulares dos vasos do xilema. Estas células possuem como função biológica nas plantas, o suporte mecânico e condução hidráulica, sendo esta última, uma função vital, responsável pelo transporte de água e minerais a longa distância, sob pressão negativa (Joyce & Steiner, 1995; Hacke & Sperry, 2001). Porém, esta função pode ser afetada, quando as plantas são submetidas a várias condições de estresse, como colonização de *Fusarium* nos vasos de plantas de caupi (Athayde Sobrinho *et al.*, 2000), condições

ambientais, como salinização do solo, ocasionando estreitamento do lúmen dos vasos do xilema, diminuindo o fluxo de água em sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Baum *et al.*, 2000) e produtos químicos como Manganês, afetando o número de elementos do xilema em fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (Santandrea *et al.*, 1998).

A funcionalidade do xilema pode ser avaliada através das características celulares dos elementos de condução, principalmente, o diâmetro do lúmen dos mesmos, permitido determinação da condutância específica estimada (Arnold & Mauseth, 1999). A eficiência na condução de água é indispensável para o desenvolvimento das plantas, mediado pelo xilema, podendo ocorrer alterações destes, afetando a condutividade (Schubert *et al.* 1999).

O diâmetro hidráulico (Dh) é o diâmetro circular da célula de transporte do xilema, em vista transversal, permitindo comparação das características hidráulicas destas células (Lewis, 1992; Lewis & Boose, 1995). Este diâmetro está relacionado aos limites quanto ao volume de água transportada no interior das plantas (Linton & Nobel, 1999). A redução no calibre dos vasos, associada a um espessamento da parede celular, representam o grau de resistência xilemática, onde o diâmetro hidráulico destas células definem a segurança e a eficiência na capacidade hidráulica, quanto ao transporte de água (Hacke *et al.*, 2000).

Frente ao avanço do estudo sobre as reações de defesa envolvendo interações entre patógenos e hospedeiros e, à importância que o caupi possui no Nordeste brasileiro, surge a necessidade de pesquisas mais aprofundadas, para determinar fatores envolvidos nas reações de defesa de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, através da avaliação de germoplasmas, ativação da resistência sistêmica adquirida por indutores abióticos e caracterização de mecanismos bioquímicos e estruturais, bem como avaliar a capacidade

funcional xilemática de plantas de caupi induzidas, de forma a viabilizar o controle da doença murcha de fusário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G.S. & PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of beans in Latin America and Africa; research methodologies and management strategies.** Colombia: CIAT Publication, 1990, 114p. (Documentos, 35)

AGRIOS, G.N. **Plant pathology.** New York: Acad. Press, Inc., 1997. 635p.

ANDRADE JÚNIOR, A.S. de; RODRIGUES, B.H.N. & BASTOS, E.A. Irrigação. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil.** Teresina: EMBRAPA, 2000, p.127-154.

ARMSTRONG, G.M. & ARMSTRONG, J.K. Biological races of the *Fusarium* causing wilt of cowpeas and soybeans. **Phytopathology**, Lancaster; v.40, p.181-193, 1950.

ARMSTRONG, G.M. & ARMSTRONG, J.K. Cowpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 1 from Nigeria. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, p.954-955, 1980.

ARNOLD, D.H. & MAUSETH, J.D. Effects of environmental factors on development of wood. **American Journal of Botany**, Ithaca, v. 86, p. 367-371, 1999.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F.M.P. & SANTOS, A.A. Doenças do caupi. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA, 2000, p. 157-177.

BAUM, S.F.; TRAN, P.N. & SILK, W.K. Effects of salinity on xilem structure and water use in growing leaves of sorghum. **New Phytologist**, Oxford, v.146, p.119-127, 2000.

BENHAMOU, N. Ultrastructural and cytochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, agent of tomato crow and root rot. **Phytopathology**, St. Paul, v.82, p.1185-1193, 1992.

BENHAMOU, N. & BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.1203-1212, 1998.

BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P.J. & NICOLE, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crow and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p.1432-1444, 1994.

BENHAMOU, N; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, Verlag, v. 204, p.153-168, 1998.

BEZERRA, A.A. de C. **Variabilidade e diversidade genética em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] precoce, de crescimento determinado e porte semi-ereto**. 1997. 105 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1997.

BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. & CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis – related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.28, p.113-138, 1990.

BRAMMAL, R.A. & HIGGINS, V.J. A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistance to *Fusarium* crown and root rot disease. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.915-925, 1988.

CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. & AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v.1, p.470-492.

CARDOSO, J.E. **Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990. 30p. (EMBRAPA-CNPAP. Documentos, 30).

CARDOSO, M.J.; RIBEIRO, V.Q.R. & MELO, F. de B. Cultivos consorciados. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA, 2000, p.107-113.

CAVALCANTI, L.S. **Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Theobroma, por benzothiadiazole (BTH)**. 2000. 82 f. (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CGIAR – Consultative Group on International Agriculture Research. **Cowpea (*Vigna unguiculata*)**. 2000. Disponível em: < <http://www.org/areas/cowpea/htm>. Acesso em 19 de fev. 2002.

CHEN, Y.; SHIN, J. & LIU, Z. Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. **Plant Physiology and Biochemistry**, Japan, v.40, p.33-39, 2002.

COHEN, Y. Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-butanoic acids. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, p.55-59, 1993.

COHEN, Y. 3-aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.44, p.273-288, 1994.

COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. **Crop Protection**, Guilford, v.18, p.267-273, 1999.

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

COULIBALY, S.; PASQUET, R.S.; PAPA, R. & GEPTS, P. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theoretical Applied Genetic**, Verlag, v.104, p. 358-366, 2002.

CORRÊA, M.P.F. Apresentação. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina, **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p.ix.

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

DANN, E.; DIERS, B.; BYRUM, J. & HAMMERSCHMIDT, R. Effect of treating soybean with 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole (BTH) on seed yields and the

level of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in field and greenhouse studies.

European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v.104, p.271-278, 1998.

DANN, E.K. & DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, London, v. 49, p.324-332, 2000.

DANTAS, J.P.; FERREIRA, M.M.M.; MARINHO, F.J.L. & AMORIM, M. do S. Seleção de cultivares e/ou linhagens de feijão caupi com tolerância ao estresse salino II. Área foliar e teor de proteínas. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina, **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p.91-103.

DELANEY, T.P. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, London, v.113, p.5-12, 1997.

EHLERS, J. Production and genetic improvement of dry grain cowpea in the USA . In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina. **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p.334-338.

EL GHAOUTH, A.; ARUL, J.; GRENIER, J.; BENHAMOU, N.; ASSELIN, A. & BÉLANGER, R. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.313-320, 1994.

FAWOLE, E.A. Evaluation of cowpea lines for resistance to wilt of cowpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, p.232-234, 1989.

FERNANDES, C.F. Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Vita 3. 1998. 65 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, 1998.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER, P.; SPECKER, N.; RELLA, M.G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNES, S.; MÉTRAUX, J.P.; KESMANN, H. & RYALS, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v.10, p.61-70, 1996.

FUNNELL, D.L. plant defenses against fungal attack: biochemistry. 2000. Disponível em: <<http://www.els.net/elsonline/html/A0001323.htm>>. Acesso em: 09 de mai. 2001.

GILCHRIST, D.G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.36, p.393-414, 1998.

GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E.E. & AUSUBEL, F.M. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.31, p.547-569, 1997.

GÖRLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G. BECKHOUE, U.; KOGEL, K.H.; OOSTENDORF, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESMANN, H. & RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activate genes expression and disease resistance in wheat, **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.629-643, 1996.

GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K. & MARTINS, E.M.F. Ação protetora do Acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.68, p.89-94, 2001.

HACKE, U.G. & SPERRY, J.S. Functional and ecological xylem anatomy. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Verlag, v.4, p.97-115, 2001.

HACKE, U.G., SPERRY, J.S. & PITTERMANN, J. Drough experience and cavitation resistance in six shrubs from the Great Basin, Utah, **Basic Applied Ecology**, Waldweg, v.1, p. 31-41, 2000.

HAMMOND-KOSAC, K.E. & JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1773-1791, 1996.

HARE, W.W. A new race of *Fusarium* causing wilt of cowpea. **Phytopathology**, Lancaster, v.43, p.291. 1957 (Abstract).

HELDT, H.W. **Plant biochemistry & molecular biology**. Oxford: Oxford University Press, 1997. 522p.

HOLLIDAY, P. *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Ferry Lane: Commonwealth Mycological Institute, 1970. (CMI descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria; 220).

HUSSAIN, M.A. & BASAHY, A.Y. Nutrient-composition and amino acid pattern of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., Fabaceae) grow in the Gizan area of Saudi Arabia. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, London v.49, p.117-124, 1998.

IBGE. **Produção agrícola municipal**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2001. 97p.

IMURA, Y.; SEKI, H.; TOYODA, K.; ICHINOSE, Y.; SHIRAISHI, T. & YAMADA, T. Contrary operations of box-1 of pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1 promotor for organ-specific expression. **Plant Physiology and Biochemistry**, Japan, v.40, p.33-39, 2002.

JAKAB, G.; COTTIER, V.; TOQUIN, V.; RIGOLI, G.; ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J.P. & MAUCH-MANI, B. β -aminobutyric acid-induced in plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.29-37, 2001.

JOYCE, B.J. & STEINER, K.C. Systematic variation in xylem hydraulic capacity within the crown of white ash (*Fraxinus americana*). **Tree Physiology**, Victoria, v.15, p.649-656, 1995.

KAUFMANN, S.; LEGRAND, M. GEOFFROY, P. & FRITIG, B. Biological functions of "pathogenesis-related" proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β - glucanase activity. **EMBO Journal**, Oxford, v.6, p.3209-3212, 1987.

KENDRICK, J.B. Seed transmission of cowpea wilt. **Phytopathology**, Lancaster, v.21, p. 979-983, 1931.

KLESSIG, D.; DURNER, J.; NOAD, R.; NAVARRE, D.A.; WENDEHENNE, D.; KUMAR, D.; ZHOU, J.M.; SHAH, J. & SILVA, H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proceeding Natl. Academic Science**, Washington, v. 97, p.8849-8855, 2000.

KOHLER, A.; SCHWINSLING, S. & CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, London, v.128, p.1046-1056, 2002.

KÚC, J. Concepts and detection of induced systemic resistance in plants and its application.

European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v.107, p. 7-12, 2001.

LATUNDE-DADA, A.O. & LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.58, p.199-208, 2001.

LEUBNER-METZGER, G. & MEINS JUNIOR, F. **Functions and regulation of plant 1,3- β -glucanase (PR-2)**. In: DATA, S.K. & MUTHUKRISHNAN, S. (Eds.). Florida: CRC Press LLC., p.49-76. 1999.

LEWIS, A.M. Measuring the hydraulic diameter of a pore or conduit. **American Journal of Botany**, Ithaca, v. 79, p. 1158-1161, 1992.

LEWIS, A.M. & BOOSE, E.R. Estimating volume flow rates through xylem conduits. **Journal of Botany**, Ithaca, v. 82, p. 1112-1116, 1995.

LINTON, M.J. & NOBEL, P.S. Loss of water transport capacity due to xylem cavitation in roots of two CAM succulents. **American Journal of Botany**, Ithaca, v. 86, p. 1538-1543, 1999.

LUCAS, J.A. **Plant pathology and plant pathogens**. London: Blackwell Science, 1998. 274p.

LYON, G.D. & NEWTON, A.C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, London, v.46, p.636-641, 1997.

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B. & BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue: II inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and two 1,3- β - glucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v.87, p.936-942, 1988

MELO, F. de B. & CARDOSO, M.J. Fertilidade, correção e adubação do solo. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA, 2000, p.127-154.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.13-18, 2001.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M. & YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Japan, v.114, p.323-328, 2001.

OLIVEIRA, J.T.A.; ANDRADE, N.C.; MIRANDA, A.S.M.; BARRETO, A.L.H.; MELO, V.M.M.; FERNANDES, C.F.; VASCONCELOS, I.M.; SILVEIRA, J.A.G.; CAVALCANTI, F.R.; FREIRE-FILHO, F.R.; FREIRE, F.C.O. & GONÇALVES, F.J.T. Atividades peroxidásica e β -1,3 glucanásica elicítadas por agentes bióticos causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 5., 2001, Teresina: **Anais ...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 19-23.

OLUWATOSIN, O.B. Genetic and environmental variation for seed yield, protein, lipid and amino acid composition in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.74, p.107-116, 1997.

OYEKAN, P.O. Occurrence of cowpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in Nigeria. **Plant Disease Reporter**, Washington, v.59, p. 488-490, 1975.

PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.2, p.1-50, 1994.

PEREIRA, P.A.A.; DEL PELOSO, M.J.; DA COSTA, J.G.C.; FERREIRA, C.M. & YOKOYAMA, L.P. Produto feijão: perspectivas de produção, do consumo e do melhoramento genético. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina, **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p.307-311.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; NIELLA, G.R.; CARVALHO, G.A.; GIOVANINI, G.R. & CASTRO, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis pernicioso* através do benzotiadiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.149-156, 2000.

RIGERT, K.W. & FOSTER K.W. Inheritance of two races of *Fusarium* wilt three cowpea cultivars. **Crop Science**, Madison, v.27, p.220-224, 1987.

RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J.P.; WALT, E. E. **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CNPAF, 1988. p.549-589.

RODRIGUES, A.A.C. & COELHO, RS.B. Efeito de dosagens e épocas de aplicação de acibenzolar-S-methyl em plantas de caupi na indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002, Recife: **Anais...** Recife: SBF, 2002. p.157.

RYALS, J.; UKNES, H.N.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H. & HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.1809-1819, 1996.

SANTANDREA, G.; SCHIFF, S. & BENNICI, A. Effects of manganese on *Nicotiana*. **Plant Science Limerick**, Ireland, v.132, p.71-82, 1998.

SATHIYABAMA, M. & BABASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**, Guilford, v.17, p.307-313, 1998.

SCHUBERT, A.; LOVISOLO, C. & PETERLUNGER, E. Shoot orientation affects vessel size, shoot hydraulic conductivity and shoot growth rate in *Vitis vinifera* L. **Plant Cell and Environmental**, England, v. 22, p.197-204, 1999.

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

SOUZA, A.L.B. de; CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. & MACHADO, J. da C. Efeito do cálcio na cura de ferimentos e na resistência de pêssego ao ataque de *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.25, p.616-624, 2001.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B. & MÉTRAUX, J. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

TUAN, Y.H.; PHILLIPS, R.D. & DOVE, C.R. Predicting integrated protein nutritional quality part I: amino acid availability corrected amino acid score and nitrogen balance data fitted to linear and non-linear models for test proteins. **Nutrition Research**, Georgia, v.19, p.1791-1805, 1999.

VANCE, C.P; KIRK, T.K. & SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.259-288, 1980.

WYATT, S.E.; PAN, S.Q. & KÚC, J. 1,3- β -glucanase, chitinase, and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.39, p.433-440, 1991.

XUE, L.; CHAREST, P.M. & HARE-JABAJI, S.H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, p.3359-365, 1998.

XUEI, X.L.; JÄRFORS, U. & KÚC, J. Ultrastructural changes associated with induced systemic of cucumber to disease: host response and development of *Colletotrichum lagenarium* in systemically protected leaves. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.66, p.1228- 1238, 1988.

ZIMMERLI, L.; JAKAB, G.; MÉTRAUX, J.P. & MAUCH-MANI, B. Potentiation of pathogen – specific defense mechanisms in Arabidopsis by aminobutyric acid. **Proceeding Natl. Academic Science**, Washington, v.97, p.12920-12925, 2000.

ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J.P. & MAUCH-MAN, B. β -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p.517-523, 2001.

MURCHA DE FUSÁRIO DO
CAUPI: REAÇÃO DE
GERMOPLASMAS, MÉTODOS
DE INOCULAÇÃO E
CONTROLE GENÉTICO DA
RESISTÊNCIA



MURCHA DE FUSÁRIO DO CAUPI: REAÇÃO DE GERMOPLASMAS, MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA.

Antonia Alice C. Rodrigues^{1,2*}, Rildo Sartori B. Coelho³

¹Fitossanidade – Departamento de Agronomia – Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manuel de Medeiros, S/N – Dois Irmãos, Recife/PE, 521710-900, e-mail: aacrodrigues@bol.com.br

²UEMA – Laboratório de Fitopatologia, C.P.09, CEP 6500-970, São Luís-MA, Brasil.

³Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA. Sede, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

(Aceito para publicação em ____/____/____)

RESUMO

Rodrigues, A. A. C. & Coelho, R. S. B. Murcha de fusário do caupi: reação de germoplasmas, métodos de inoculação e controle genético da resistência. **Summa Phytopathologica**, 2003.

A murcha de fusário em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F.Smith) Snyder & Hansen, é um dos principais problemas da cultura, sendo o controle genético a forma mais eficaz de combate dessa doença. No presente estudo, foram avaliadas 30 cultivares e linhagens de caupi em

relação ao isolado ISO-PE, verificado o efeito de métodos de inoculação e avaliação no comportamento da cultivar BR-17 Gurguéia, utilizando-se os isolados ISO-PE e ISO-PA do patógeno. E estudado, ainda, o controle genético da resistência na linhagem L-288004 através da avaliação de populações segregantes obtidas do cruzamento com a cultivar BR-17 Gurguéia. As inoculações foram realizadas em plantas com sete dias após plantio, pelos métodos de ferimento de raízes e *deeping*. No primeiro, foram feitos ferimentos em um dos lados do sistema radicular e deposição de 20 mL de suspensão de conídios/ planta e, no segundo, as plantas foram removidas de copos contendo vermiculita, lavadas em água corrente, cortadas as extremidades das raízes e imersas por cinco minutos na suspensão de conídios e plantadas em vasos contendo solo esterilizado. A avaliação dos experimentos foi efetuada 25 dias após germinação, com base em escala de notas, índice de doença e percentagem de lesão. Cerca de 50% das cultivares apresentaram resistência ao patógeno, destacando-se as linhagens L-288004 e L-190004. Os dois métodos de inoculação proporcionaram o mesmo tipo de reação na cv. BR-17 Gurguéia, sendo que o método *deeping* induziu sintomas mais rápido que o ferimento de raízes. Verificou-se correlação positiva entre os métodos de avaliação, no entanto, a escala de notas e índice de doença demonstraram maior eficiência na caracterização da resistência das cultivares. Comparando o efeito dos isolados, ISO-PE apresentou maior agressividade na cv. BR-17 Gurguéia, associado com os métodos de inoculação tipo *deeping* e ferimento de raízes, constatado pela avaliação baseada em escala de notas e índice de doença. Na análise da herança da resistência da geração F_2 , foi encontrada frequência de 13 plantas resistentes para 3 suscetíveis em uma população de 386 plantas, indicando segregação de dois genes

independentes, sendo um deles com efeito epistático dominante, com base no teste do Qui-quadrado, conferindo resistência ao isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

Palavras-chave: *Vigna*, *Fusarium*, teste de segregação

Rodrigues, A. A. C. & Coelho, R S. B. Cowpea *Fusarium* wilt: reaction of germ plasm, methods of inoculation, and genetic control of resistance. **Summa Phytopathologica**, 2003.

Fusarium wilt of cowpea [Vigna unguiculata (L). Walp], caused by Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum (E.F.Smith) Snyder & Hansen is one of the most important diseases for this crop, and the genetic resistance is the most efficient method of control. Assesments of 30 cowpea cultivars and lineages inoculated with the isolate ISO-PE of the Fusarium were carried out and it was evaluated inoculation methods and reaction of the cv. BR-17 Gurguéia, utilizing ISO-PE and ISO-PA pathogenic isolates. Resistance genetic control on cowpea L-288004 strain also was studied through evaluation of segregant populations from crossing with cultivar BR-17 Gurguéia. The inoculations in seven days old plants were done by the root wound and deeping methods. In the first case, one side of the root system was scratched and 20 mL of conidia suspension was poured on each plant. In the second one, plants were removed from cups which contained vermiculite, washed with water, and tip roots were cut and sunk into conidia suspension for five minutes, being planted in esterilized soil. Evaluation was done 25 days after germination, based on grade scale, disease intensity and severity. About 50% of the cultivars showed resistance to the pathogen, mainly L-288004 and L-190004 strains. Both inoculation methods induced the same reaction on cultivar BR-17 Gurguéia. Nevertheless, deeping method induced

*symptom occurrence earlier than root wound method did. A positive correlation between the assessment methods were observed. However, grade scale and disease intensity demonstrated higher efficiency on resistance characterization of the cultivars. Comparing the effect of isolates, ISO-PE was more aggressive on cultivar BR-17 Gurguéia associated with both inoculation methods, what was confirmed through evaluation based on grade scale and disease intensity. Inheritance analysis of F₂ showed frequency of 13 resistant plants to three susceptible ones within a population of 386 plants, suggesting segregation of two independent genes, one recessive and the other dominant, based on Chi-square test, conferring resistance to *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*.*

Additional keywords: *Vigna*, *Fusarium*, *segregation test*

Fusarium oxysporum f. sp. *tracheiphilum* (E.F.Smith) Snyder & Hansen, agente causal da murcha de fusário, é um patógeno do solo, de ocorrência comum em regiões de cultivo do caupi. Induz sintomas como amarelecimento, seguido de desfolhamento precoce, murcha e morte da planta, sendo comum descoloração dos vasos, adquirindo coloração castanha, decorrente da colonização necrotrófica do patógeno (19, 28).

Devido a grande capacidade de sobrevivência do patógeno no solo, a rotação de cultura torna-se inviável, sendo o controle da murcha de fusário feito, basicamente, através do uso de cultivares resistentes. Para isso, é necessário o conhecimento da variabilidade do patógeno, reação de germoplasmas a doença e tipo de herança da resistência do hospedeiro.

De acordo com EHLERS (10), são conhecidas quatro raças de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. As raças 1 e 2 foram descritas na Carolina do Sul, onde a raça 1, além do caupi ataca soja e crisântemo (3, 4, 21). As raças são diferenciadas através das cultivares

Chinese Red, suscetível às raças 2 e 3; Groid, suscetível à raça 1 e; Arlington, suscetível à raça 3 (30). SOTO & SAUVE (29) testaram cinco isolados de *Fusarium*, pertencentes a *F. solani* e *F. oxysporum*, além das formas especiais *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* raça 1, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* raça 2, *F. oxysporum* f. sp. *glycines* em soja. Destes, *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* raça 1 induziu o segundo maior índice de doença, apresentando correlação positiva entre severidade e produção de micélio. As raças 3 e 4 ocorrem na Califórnia, sendo que a raça 4 foi detectada em 1989, permaneceu confinada por vários anos, e entre 1997 e 2001 ressurgiu, causando sérios danos à cultura, dependendo do nível de inóculo no solo, sugerindo crescente disseminação (27).

ARMSTRONG & ARMSTRONG (4), avaliando o comportamento de cultivares de caupi frente às raças 1,2,3 e ao isolado Nigéria, detectaram que as cultivares Magnólia, Iron PI 293520, Iron Tvú 990, Iron Tvú 1072 e Iron Tvú 1611 foram resistentes às três raças, e que o isolado em estudo pertencia claramente à raça 1. Avaliando a resistência de seis linhagens de caupi quanto à murcha, FAWOLE (11) verificou que apenas a Tvú 347 comportou-se como resistente com 4% de infecção, provavelmente pela capacidade de sintetizar substâncias que retardam ou inibem o desenvolvimento do patógeno.

Através da seleção em progênies resultantes do cruzamento das cultivares California Blackeye (CB) nº 5 e PI 166 146, HELMS et al. (14, 15) obtiveram as cultivares CB 46 e CB 88 resistentes à raça 3 de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e portadoras do gene Rk que confere, também, resistência às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* (Kofoed & White) Chitwood. Deve ser ressaltado que, em cultivares resistentes, à murcha, *M. javanica* (Treub) Chitwood afeta a resistência em relação a todas raças de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (31, 13, 22).

Segundo EHLERS (10), é constante a preocupação com programas de melhoramento de cultivares que implementem o manejo da cultura do caupi, visando o aumento da produção, qualidade dos grãos e redução dos custos de produção. Foram desenvolvidas cultivares de caupi pela Universidade da Califórnia, com resistência a algumas raças, como a Califórnia Blackeye (CB) 5, resistente à raça 1, CB 46 e CB 88 resistentes às raças 1, 2 e 3, mais tarde comportando-se como suscetíveis a essas raças (27). Atualmente, a CB 46 é resistente apenas à raça 3, a CB 5 é suscetível às raças 3 e 4 e a cultivar CB 27, lançada recentemente, é resistente às raças 3 e 4 de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (9).

Na avaliação do comportamento de cultivares de caupi, em relação a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, foi observado uso de metodologias variadas tanto em relação ao método de inoculação, quanto de avaliação da severidade de sintomas. E mesmo que um método de inoculação seja de uso mais freqüente entre alguns pesquisadores, como o método *deeping*, o tempo de permanência das raízes no inóculo é variado, não havendo padronização. O mesmo ocorre em relação à avaliação, com uso de escalas variadas, que incluem percentagem de descoloração vascular, percentagem de área necrosada do xilema e número de plantas murchas e com amarelecimento (31, 4, 30, 21, 11). A falta de padronização dessas metodologias pode suprimir ou expressar respostas diferentes de cultivares frente ao patógeno, conduzindo a resultado errôneo. Desta forma, é essencial o uso de uma metodologia adequada, que permita a detecção de resistência das cultivares

Apesar da praticidade de uso do método de controle genético da murcha de fusário em caupi, estudos abordando esse aspecto são bastante limitados nas condições brasileiras. De acordo com RIGERT & FOSTER (21), estudos de resistência em cultivares de caupi

iniciaram em 1898, com a cultivar Iron, sendo que progênies resultantes de cruzamentos dessa cultivar com a suscetível Califórnia Blackeye comportaram-se como resistentes, sendo mais tarde observada a segregação de um único gene de resistência para a cultivar Iron, frente à raça 1. A resistência para as raças 2 e 3 é controlada por dois genes dominantes (12). Porém, RIGERT & FOSTER (21), estudando a herança da resistência para as raças 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, nas cultivares Califórnia Blackeye (CB 3) e a linhagem 7964, determinaram resistência conferida por um único gene de dominância incompleta para a raça 2 e um único gene de dominância completa para a raça 3. A cultivar CB 5 apresentou suscetibilidade a essas duas raças.

Visando fornecimento de subsídios para controle da murcha de fusário, testou-se o comportamento de germoplasma de caupi, quanto à resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, além de avaliar isolados desse patógeno e métodos de inoculação sobre cultivar como padrão de suscetibilidade, através de escala de notas, índice de doença e percentagem de lesão, incluindo, também, estudos da herança da resistência da população F₂, derivadas do cruzamento de BR-17 Gurguéia e L-288004, em relação ao patógeno.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da resistência de germoplasma de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

O isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foi obtido de plantas de caupi, exibindo sintomas da doença, proveniente do município de Floresta-PE, e conservado pelo método Castellani (26).

Foram avaliadas 30 cultivares e linhagens de caupi, procedentes do banco ativo de germoplasma da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA e Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio Norte - CPAMN/EMBRAPA.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, sendo as plantas cultivadas em vasos plásticos, com capacidade de 3 dm³, contendo solo esterilizado com brometo de metila (CH₃Br), mantendo-se três plantas/vaso.

Para produção do inóculo, o patógeno foi cultivado em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA) e incubado durante sete dias em temperatura ambiente aproximada de 25° C. O inóculo foi preparado adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa, efetuando-se raspagem da superfície das colônias, com lâminas de vidro e filtragem em gaze dupla, sendo a suspensão ajustada para 1x10⁶ conídios.mL⁻¹, com auxílio de câmara de Neubauer.

A inoculação foi realizada em plantas de caupi com sete dias de idade, através de ferimento de raízes, conforme MENEZES (16), aplicando-se 20 mL da suspensão do inóculo por planta.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições, e cada parcela constituída por três plantas/vaso, sendo os dados submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, sendo os dados transformados em $\sqrt{(x + 0.5)}$.

A avaliação foi realizada 25 dias após germinação, utilizando-se os seguintes métodos de avaliação: escala de notas de 1 a 9, conforme SCHOONHOVEN & PASTOR-

CORRALES (25); índice de doença, sendo as notas transformadas em índice de McKinney (5) e percentagem de lesão da região do colo até a inserção dos cotilédones.

Avaliação de isolados e métodos de inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em cultivar de caupi

Foi utilizada a cultivar BR-17 Gurguéia, sendo o plantio foi efetuado em vasos plásticos com capacidade de 3 dm³, contendo solo esterilizado com brometo de metila. Outra parte das sementes foi semeada em copos de 250 mL de capacidade contendo vermiculita, mantendo-se duas plantas por recipiente.

Para a produção do inóculo, foram utilizadas colônias dos isolados ISO-PE e ISO - PA, provenientes dos Estados de Pernambuco e Pará, respectivamente, com sete dias de idade, onde foram adicionados 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa e realizada a raspagem da superfície das colônias com lâminas de vidro. A suspensão de conídios foi ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹, com auxílio de câmara de Neubauer.

A inoculação foi realizada nas plantas aos sete dias de idade, pelo método de ferimento de raízes (16), ferindo-se um dos lados do sistema radicular, com deposição de 20 mL de suspensão/planta e pelo método *deeping* (18). As plantas, removidas dos copos contendo vermiculita, tiveram o sistema radicular lavado em água corrente com corte de 1 cm da extremidade das raízes, sendo imerso o terço inferior na suspensão de conídios por cinco minutos e foram plantadas em seguida. As testemunhas dos dois métodos de inoculação foram tratadas com água destilada esterilizada.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com arranjo em fatorial 2x2, sendo uma cultivares, dois isolados, dois métodos de inoculação com quatro repetições. A unidade experimental constou de três plantas/vaso.

A avaliação foi realizada 25 dias após germinação, baseada em escala de notas e índice de doença, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Estudo da Herança da Resistência

Foi realizado o plantio de 386 sementes da população F₂, resultante do cruzamento de BR-17 Gurguéia x L-288004, caracterizadas como padrões de suscetibilidade e resistência, respectivamente, ao patógeno *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

A população F₂ utilizada neste experimento foi obtida por COELHO (7), através da emasculação, seguida de polinização, com autofecundação de plantas da geração F₁.

As plantas foram cultivadas individualmente, em vasos plásticos com capacidade de 1,0 dm³, contendo solo esterilizado com brometo de metila. Aos sete dias de idade foram inoculadas com o isolado ISO-PE preparado a partir de colônias do fungo, com sete dias de idade, através da raspagem das placas com lâmina de vidro, ajustando-se a concentração para 1×10^6 conídios.mL⁻¹, com auxílio de câmara de Newbauer, sendo a inoculação realizada pelo método de ferimento de raízes, depositando-se 20 mL do inóculo por planta. A avaliação foi realizada aos 25 dias após a germinação, utilizando-se escala de notas.

A análise da segregação da população F₂ de plantas de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foi realizada através do teste de Qui-quadrado (X²), para observar se a resistência da linhagem L-288004 estava condicionada por um ou mais genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de Cultivares e Linhagens de Caupi a *F. oxysporum f. sp.*

tracheiphilum

De acordo com os resultados, em torno de 50, 36,7 46,7 % das cultivares e linhagens apresentaram resistência a *F. oxysporum f. sp. tracheiphilum* (Quadro 1), quando avaliados com base em escala de notas, índice de doença e percentagem de lesão, respectivamente, 25 dias após germinação, destacando-se as linhagens L-288004 e L-190004 como altamente resistentes.

As cultivares e linhagens L-525-004-A, CNCx-1115-25F, IT89KD-381 e TE90-91-195-7F apresentaram variação entre resistência e reação intermediária nos métodos de avaliação pelo índice de doença e percentagem de lesão. Na avaliação pela escala de notas, essas cultivares comportaram-se como resistentes.

A cultivar TE90-172-33F apresentou reação de suscetibilidade nos três métodos. O mesmo não foi observado para a cultivar Cariri V. Clara, que comportou-se como altamente suscetível quando avaliada pela percentagem de lesão e com reação intermediária pelos outros dois métodos, assemelhando-se à cultivar BR-17 Gurguéia, que apresentou reação intermediária quando avaliada pela escala de notas e índice de doença. Segundo ALBUQUERQUE et al. (1), essa cultivar é considerada como padrão de suscetibilidade a *F. oxysporum f. sp. tracheiphilum*, uma vez que apresentou evolução contínua da infecção; 10 dias após inoculação apresentou índice de doença de 39,54, chegando até 97,90 em 30 dias após inoculação, diferindo das demais cultivares testadas por esses autores. A cultivar CNCx 0434 apresentou reação intermediária de resistência a esse isolado, no entanto, é

recomendada como fonte de resistência no controle à murcha de fusário (2). A diferença de reação apresentada por essas cultivares pode ser em decorrência da diferença de patogenicidade do isolado usado no experimento, visto que os isolados utilizados foram de regiões fisiográficas distintas, e em ambos os experimentos, tratou-se de apenas um isolado, ou seja, uma raça do patógeno não identificada, que provavelmente não se trata da mesma. Fato semelhante foi comprovado por SALA et al. (23), com o comportamento da cultivar IAC-Carioca em relação às raças de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, que apresentou resistência às raças 1, 2 e 3, embora, em experimentos anteriores tenha se mostrado como suscetível. Tal comportamento foi atribuído à diferença de isolados usados nos experimentos

Por outro lado, comportamento diferenciado de algumas cultivares, em experimento de localidades distintas, também, pode ser influenciado por fatores ambientais, que dificultam a expressão da resistência ou de suscetibilidade a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (30), sendo necessário testar a reação de cultivares nas mesmas condições de cultivo.

Em relação ao método de avaliação pela percentagem de lesão, ocorreu grande variação na reação das cultivares, quando comparado com os métodos escala de notas e índice de doença, como nas linhagens L-539-004 (B2), Bico de Pato, IT89KD-245 e TE90-172-42E, que apresentaram reação de suscetibilidade nestes dois métodos e reação intermediária por percentagem de lesão. Comportamento contrário foi observado nas cultivares BR-17 Gurguéia e Cariri-V. Clara, que expressaram reação intermediária nos métodos anteriores e suscetibilidade em percentagem de lesão.

A variação ocorrida no método percentagem de lesão, muitas vezes, não representa o quadro sintomático da murcha de fusário, já que plantas aparentemente sadias, apresentaram 100 % de escurecimento na região compreendida entre o colo e a inserção do cotilédone, enquanto plantas com sintomas externos de murcha apresentavam baixo percentual de tecido necrosado. Esta variação resultou em um alto coeficiente de variação (43,83 %), incorrendo em erro experimental grande, tornando esse método de avaliação inadequado para determinar fontes de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi.

NASCIMENTO et al. (17) distinguiram com precisão plantas resistentes de suscetíveis a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, através dos sintomas internos do sistema vascular de plantas de feijoeiro comum, quando o método de inoculação adotado foi do tipo *deeping*, informando, ainda, que a avaliação dos sintomas externos apresenta maior facilidade de uso, sem necessidade de eliminação das plantas, sendo, inclusive, sugerido como método de avaliação padrão. Esse fato pode estar relacionado com a reação de resistência intermediária da cultivar BR-17 Gurguéia a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, quando avaliada por escala de notas e índice de doença, considerando que o método de inoculação adotado foi do ferimento de raízes e que, provavelmente, a área do sistema radicular das plantas em contato com o inóculo não tenha proporcionado uma eficiente penetração do patógeno. Nesse caso, a avaliação por percentagem de lesão apresentou maior sensibilidade na detecção da suscetibilidade dessa cultivar.

As cultivares suscetíveis apresentaram um processo infeccioso com sintomas característicos da doença, como sintomas externos, apresentando amarelecimento e queda de folhas e, interno, com escurecimento dos vasos, em decorrência da colonização

necrotrófica, onde o fungo invadiu o interior do elemento de vaso xilemático chegando, inclusive, à sua obliteração total, impedindo o fluxo de água. (Figura 1).

Quadro 1 - Reação de cultivares de caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* com base na escala de notas, índice de doença e percentagem de lesão aos 25 dias após a germinação

CULTIVAR	ESCALA DE NOTAS*		ÍNDICE DE DOENÇA**		% DE LESÃO***	
	MÉDIA ¹	REAÇÃO ²	MÉDIA ¹	REAÇÃO ²	MÉDIA ¹	REAÇÃO ²
L-539-004-A (B ₂)	7,41 a	S	83,95 a	S	34,54 abc	I
TE90-172-33F	7,18 ab	S	82,09 ab	S	75,95 ab	S
Bico de Pato	6,74 abc	S	75,22 ab	S	40,20 abc	I
IT89KD-245	6,74 abc	S	75,21 ab	S	55,78 abc	I
TE90-172-42E	6,71 abc	S	80,58 ab	S	63,99 abc	I
TE90-180-10F	6,24 abcd	I	73,61 ab	S	40,20 abc	I
L-561-003-A	6,07 abcde	I	67,63 abc	I	54,30 abc	I
CNCx 0434	5,49 abcde	I	64,04 abc	I	45,64 abc	I
CNCx 676-51F	5,24 abcdef	I	58,58 abc	I	39,45 abc	I
BR-17 Gurguéia	5,17 abcdef	I	59,49 abcd	I	74,25 ab	S
TE90-180-3E	5,03 abcdef	I	57,72 abcd	I	21,38 abc	R
Cariri - V. Clara	4,91 abcdefg	I	55,56 abcd	I	92,18 a	S
Monteiro	4,82 abcdefg	I	67,56 abc	I	35,65 abc	I
CNCx-955-IF	4,46 abcdefg	I	52,68 abcd	I	15,41 abc	R
TE90-180-88E	3,93 abcdefg	I	46,49 abcde	I	29,65 abc	R
TE90-91-195-7F	3,46 abcdefg	R	41,64 abcde	I	4,00 bc	R
TE87-98-8G	3,11 abcdefg	R	38,15 abcde	I	37,55 abc	I
IT89KD-381	3,06 abcdefg	R	38,12 abcde	I	23,99 abc	R
L-532-004-A	2,53 bcdefg	R	33,97 abcde	I	49,19 abc	I
CNCx-1115-25F	2,33 cdefg	R	28,76 bcde	R	46,79 abc	I
L-525-004-A	2,07 defg	R	23,17 cde	R	44,02 abc	I
CNCx-1114-4F	2,07 defg	R	22,79 cde	R	8,10 abc	R
IT89KD-260	2,07 defg	R	28,56 bcde	R	29,75 abc	R
TE90-179-14E	1,96 defg	R	23,29 cde	R	20,77 abc	R
BR14-Mulato	1,91 defg	R	22,72 cde	R	6,89 bc	R
CNCx-409-12F	1,69 efg	R	20,23 cde	R	20,48 abc	R
TE87-98-13G	1,69 efg	R	20,23 cde	R	5,62 bc	R
TE90-180-13F	1,23 fg	R	17,66 de	R	2,80 c	R
L-288-004	1,00 g	R	11,00 e	R	10,01 abc	R
L-190-004	1,00 g	R	16,00 de	R	32,88 abc	R
CV(%)	19,55		20,89		43,83	

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

²Reação: S- suscetibilidade, I- intermediária, R- resistente

*Graus de infecção: 1,0 - 3,5 - resistente; >3,5 < 6,5 - intermediário; ≥6,5 - 9 - suscetível

** Índice de doença: 0 - 33,33 - resistente; >33,33 e < 66,67 - intermediário; ≥ 67,67 % - suscetível

*** Percentagem de lesão: 0 - 33% - resistente; >33 e < 66 % - intermediário; ≥ 66 % - suscetível

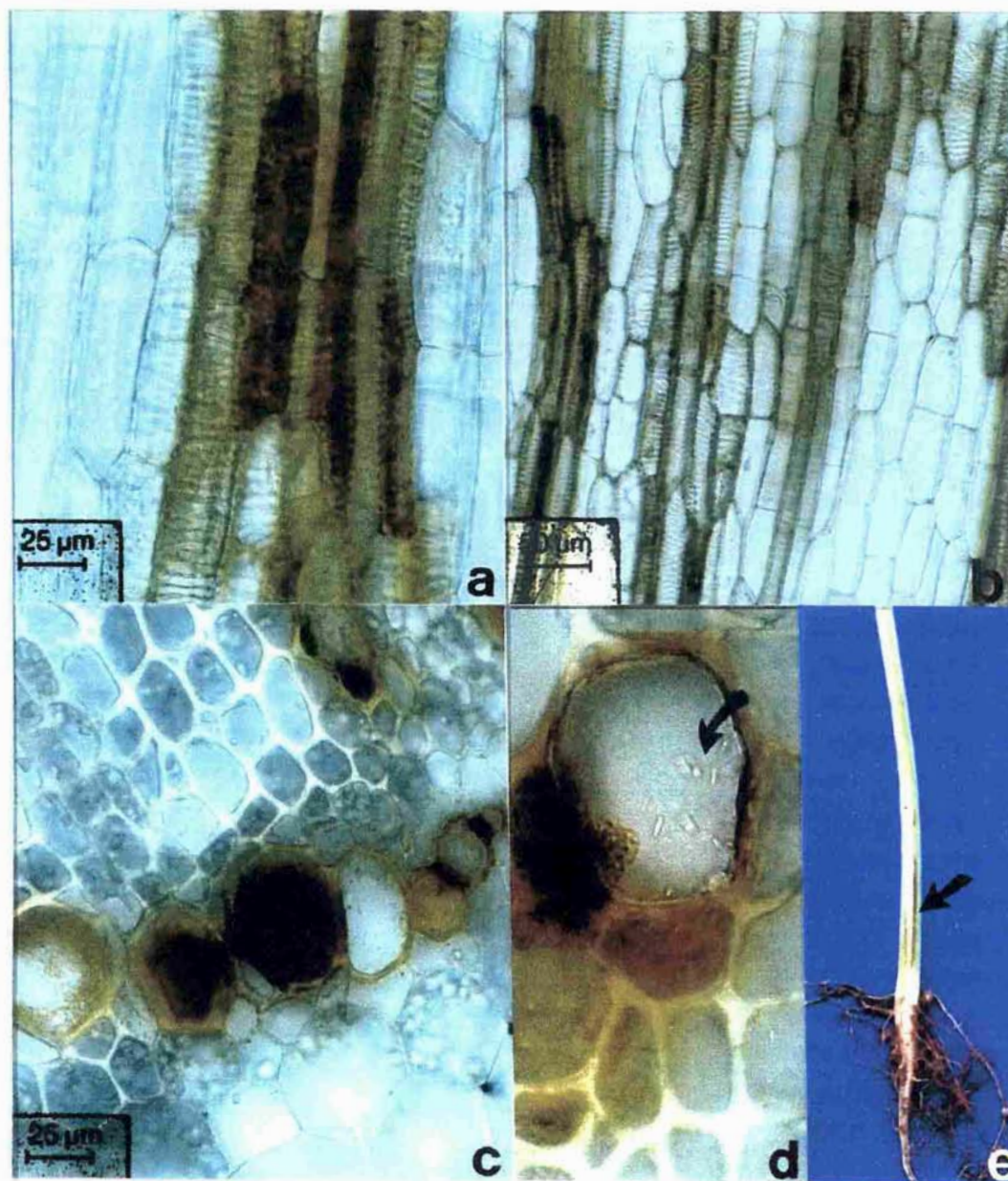


Figura 1 - Sintomas de murcha de fusário na cultivar de caupi BR-17 Gurguéia: Escurecimento do xilema, principalmente na ornamentação dos vasos (corte longitudinal) (a e b); vaso colonizado (seta), com obliteração total e parcial causada por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (corte transversal) (c e d); escurecimento do caule (seta), caracterizando necrose, devido à colonização necrotrófica do patógeno (e).

Na análise de correlação entre os três métodos de avaliação de resistência de cultivares, foi observada correlação positiva entre os três métodos de avaliação, embora, a maior correlação tenha sido entre escala de notas e índice de doença (Quadro 2), indicando que esses dois parâmetros demonstraram ser mais eficientes para a caracterização de resistência de cultivares e linhagens de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

Quadro 2 - Coeficientes de correlação entre métodos de avaliação de 30 cultivares e linhagens de caupi inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

MÉTODO DE AVALIAÇÃO ¹	ESCALA DE NOTA	ÍNDICE DE DOENÇA	% LESÃO
ESCALA DE NOTAS	1,00*	0,99*	0,62*
ÍNDICE DE DOENÇA	0,99*	1,00*	0,62*
% LESÃO	0,62*	0,62*	1,00*

¹ Correlação de Pearson a 5% de probabilidade.

* significativo

Avaliação de isolados e métodos de inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* na cultivar BR-17 Gurguéia.

A cultivar BR-17 Gurguéia apresentou reação diferenciada em relação aos isolados e mesmo comportamento quanto aos métodos de inoculação em uma concentração de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ (Quadro3).

O isolado ISO-PE apresentou maior agressividade que o ISO-PA, na cultivar BR-17 Gurguéia que se comportou como altamente suscetível, quando avaliada por escala de notas e índice de doença. O isolado ISO-PA não demonstrou variação na patogenicidade, induzindo reação intermediária de resistência nessa cultivar.

Quadro 3 - Efeito dos isolados ISO-PE e ISO-PA de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sobre a cultivar BR-17 Gurguéia, através de diferentes métodos de avaliação

ISOLADO	MET. INOCULAÇÃO	NOTA*	REAÇÃO ¹	ÍNDICE DE DOENÇA**	REAÇÃO ¹
ISO-PE	DEEPING	8,83 b	S	98,14 b	S
	FERIMENTO RAIZ	8,08 b	S	89,81 b	S
ISO-PA	DEEPING	4,16 a	I	45,82 a	I
	FERIMENTO RAIZ	5,66 a	I	62,95 a	I
CV(%)		18,21		18,40	

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

¹ Reação: S- suscetível, I- intermediária, R- resistente;

*Graus de infecção: 1,0 - 3,5 – resistente; >3,5 < 6,5 – intermediária; ≥6,5 - 9 – suscetível

** Índice de doença: 0 - 33,33 – resistente; >33,33 e < 66,67 – intermediária; ≥ 67,67 % suscetível

Foi observada diferença entre os métodos de inoculação. O método de inoculação tipo *deeping*, na cultivar BR-17 Gurguéia, proporcionou o mesmo tipo de reação que o método de ferimento de raízes, quando inoculada com o ISO-PE, apresentando índice de doença de 98,14 e 89,81, respectivamente, comportando-se como altamente suscetível. Porém, o comportamento da mesma cultivar, em relação ao ISO-PA, demonstrou reação intermediária de resistência, nos dois métodos avaliados. De acordo com os resultados, os métodos de inoculação apresentaram a mesma eficiência, sendo que a variação ocorreu entre os isolados, indicando que o ISO-PE é mais agressivo que o ISO-PA, sendo confirmado pelos dois métodos de avaliação adotados.

Apesar dos dois métodos de inoculação terem proporcionado o mesmo tipo de reação nas plantas de caupi, por ocasião da avaliação, o método *deeping* induziu sintomas mais rápido do que o método ferimento de raízes, provavelmente pela maior exposição do sistema radicular das

plantas ao patógeno, ou mesmo, pela maior sensibilidade das plantas de caupi ao transplante, prática exigida no método de inoculação. No método tipo ferimento de raízes, somente em metade do sistema radicular das plantas ocorre deposição do inóculo, diminuindo a probabilidade de penetração do fungo nas raízes com ferimento. Para PASTOR-CORRALES & ABAWI, (18), o método tipo *deeping* não representa as condições naturais de infecção, uma vez que em campo, a distribuição do inóculo é irregular e nem todas as raízes apresentam ferimentos, que proporcionem a penetração dos patógenos. Porém, é um método adotado com frequência nos experimentos de reação de cultivares de feijoeiro comum e de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (30, 11, 24, 17, 1, 23).

CAVALCANTI et al. (6) compararam os métodos de inoculação tipo perfuração do solo (ferimento de raízes) e imersão de raízes (*deeping*) na inoculação de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em feijoeiro comum, e observaram que este último proporcionou maior eficiência na expressão da murcha de fusário.

Contudo, torna-se necessário a padronização de métodos de inoculação e avaliação, que expressem os sintomas da doença murcha de fusário e, conforme observado neste trabalho, os métodos de inoculação tipo *deeping* e ferimento de raízes associado com a avaliação dos sintomas externos das plantas apresentaram a mesma eficiência e podem ser usados em estudo de detecção de fontes de resistência de cultivares de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

Herança da Resistência

O valor do Qui-quadrado obtido para testar a segregação mendeliana mostrou a frequência de 13 plantas resistentes para 3 plantas suscetíveis (Quadro 4), observada na população F₂ derivada do cruzamento entre BR-17 Gurguéia e L-288004 inoculada com o ISO-PE de *F.*

oxysporum f. sp. *tracheiphilum*, sugerindo a segregação de dois genes independentes, um deles com efeito epistático dominante, condicionando a resistência. Este resultado difere de estudos anteriores sobre a herança da resistência a murcha de fusário, que revelaram um único gene de dominância incompleta e completa às raças 2 e 3, respectivamente (21), e dois genes dominantes (12).

Segundo RAMALHO et al. (20), quando ocorre a participação de dois genes com distribuição independente, com dois alelos cada, um alelo é necessário para a expressão da resistência, enquanto um alelo recessivo condiciona a ausência de resistência. Em um outro locus, o alelo dominante é epistático em relação ao recessivo, inibindo sua expressão, e pode ocorrer, ainda, epistasia nos dois locos, sendo denominada de dominante e recessiva.

Para a herança da resistência à mancha angular do feijoeiro, a resistência proveniente de Ouro Negro é conferida por um gene dominante e em 'US Pinto 111' a um gene recessivo. Esses dois locos segregaram de forma independente, podendo permitir o estabelecimento de cultivares com resistência mais duradoura que as duas separadas, uma vez que para ser quebrada, será necessário que o patógeno contenha dois genes de virulência (8).

Este é o primeiro relato sobre resistência conferida por um gene recessivo e um dominante não ligados, à murcha de fusário e poderá contribuir de forma significativa para programas de melhoramento do caupi, com doação de genes de resistência pela linhagem L-288004, visando o controle genético da doença, porém, sendo necessário, a identificação da raça de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, usado neste experimento.

Quadro 4 - Segregação de genes de resistência da população F₂ à murcha de fusário em caupi, resultante do cruzamento de BR-17 Gurguéia x L-288004

GENÓTIPO	FREQUENCIA OBSERVADA	FREQUENCIA ESPERADA	DESVIOS	(DESVIOS) ²	X ²	P
RESISTENTE	312	313,6	-1,6	2,56	0,008	
SUSCETIVEL	74	72,4	1,6	2,56	0,035	
X ² 5%					0,043	3,84 ^{ns}

^{ns} Não significativo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, M.P. de; COELHO, R. S.B. & PEREZ, J.O Avaliação de linhagens e cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) em relação a *Fusarium oxysporum* f. s.p. *tracheiphilum*. **Caderno Omega**, Recife, p.5-7, 2001.
2. ARAÚJO, J.P.P. de; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P. das; FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P.; GUIMARÃES, C.M. & SILVEIRA FILHO, A. **Cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp; descrição e recomendações técnicas de cultivo**. Goiania, CNPAF, 1984. 82p. (CNPAF. Circular Técnica, 18).
3. ARMSTRONG G.M., ARMSTRONG J.K. Biological races of the *Fusarium* causing wilt of cowpeas and soybeans. **Phytopathology**, Lancaster; v.40, p.181-193, 1950.
4. ARMSTRONG G.M., ARMSTRONG J.K. Cowpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 1 from Nigeria. **Plant Disease**, St. Paul, v.64, p.954-955, 1980.

5. BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. & OTOYA, M.M. Resistência de germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17,p.102-103. 1990.
6. CAVALCANTI, L.S.; COELHO, R.S.B. & PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.1-5, 2002.
7. COELHO, R.S.B. (Coord.). Determinação da herança da resistência de genótipos de caupi (*Vigna unguiculata*) em relação às principais doenças causadas por vírus e fungos, que ocorrem no Estado de Pernambuco. Recife: FACEPE, 1998. 33f. Relatório APQ: 0641-5.01/95.
8. CORREIA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.V.; OLIVEIRA, M.L.P.; NIETCHE, M.A.M. & BARROS, E.G. DE. Herança da resistência à mancha-angular do feijoeiro e identificação de marcadores moleculares flanqueando o loco de resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.27-32, 2001.
9. EHLERS, J. & HALL, T. Description of 'California Blackeye N. 27'. In: **DRYBEAN WORK GROUP MEETING**, Riverside 1999. Disponível em: <<http://www.agri.ucdavis.edu/images/cb27pdf>> Acesso em 02 de out. 2002.

10. EHLERS, J. Production and genetic improvement of dry grain cowpea in the USA . In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI, 5., 2001, Teresina. **Anais...** Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p.334-338.
11. FAWOLE, E.A. Evaluation of cowpea lines for resistance to wilt of cowpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, p.232-234, 1989.
12. HARE, W.W. A new race of *Fusarium* causing wilt of cowpea. **Phytopathology**, Lancaster, v.43, p.291. 1953 (Abstract).
13. HARRIS, A.R. & FERRIS, H. Interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* and *Meloidogyne* ssp.in *Vigna unguiculata*. 3 Pathogenesis by *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* as affected by *M. javanica* and host cultivar. **Plant Pathology**, London, v.40, p.465-457, 1991.
14. HELMS, D.; PANELLA, L.; BUDDENNHAGEM, I.W.; TUCKER, C.L. & GEPTS, P.L. Registration of California Blackeye 46 cowpea, **Crop Science**, Madison, v.31, p.1703, 1991a.
15. HELMS, D.; PANELLA, L.; BUDDENNHAGEM, I.W.; TUCKER, C.L. & GEPTS, P.L. Registration of California Blackeye 88 cowpea, **Crop Science**, Madison, v.31, p.1703-1704, 1991b.

16. MENEZES, M. **Relações entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (ATK) Syd. & Hans. e diferentes hospedeiros não suscetíveis.** 1972. 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1972.
17. NASCIMENTO, S.R.C.; MARINGONI, A.C. & KUROSZAWA, C. Comportamento de variedades e linhagens de feijoeiro ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.458-463, 1995.
18. PASTOR-CORRALES, M. A.; ABAWI, G. S. Reactions of selected bean germ plasm to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.990-993, 1987.
19. PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS-FILHO, F.M. Doenças do caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; RESENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v.2, p.233-244.
20. RAMALHO, M.; SANTOS, J.B. DOS; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Editora Globo, 1994. 359p.
21. RIGERT, K.W. & FOSTER K.W. Inheritance of two races of *Fusarium* wilt in three cowpea cultivars. **Crop Science**, Madison, v.27, p.220-224, 1987.

22. ROBERTS, P.A.; FRATE, C.A.; MATTHEWS, W.C. & OSTELI, P.P. Interactions of virulent *Meloidogyne incognita* and *Fusarium* wilt on resistant cowpea genotypes. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.1288-1295, 1995.

23. SALA, G.M.; ITO, M.F. & CARBONELL, S.A.M. Reação de cultivares de feijoeiro comum, recomendadas para o Estado de São Paulo, a raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.27, p.425-428, 2001.

24. SARTORATO A. & RAVA, C.A **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle** Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994 .300p.

25. SCHOONHOVEN, A.V. & PASTOR-CORRALES, M.A. Standard system for the evaluation of beans germplasm. **Centro International de Agricultura Tropical – CIAT**, Cali, 54p. 1987.

26. SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Egham: International Mycological Institute, 1994. 122p.

27. SMITH, S.N.; HELMS, D.M. & TEMPLE, S.R. The distribution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* race 4. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p.649, 1999 (Abstract).

28. SOBRINHO, C.A.; VIANA, F.M.P. & SANTOS, A.A. Doenças do caupi. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA, 2000, p. 157-177.
29. SOTO, E. & SAUVE, R. Reaction de diferentes cultivares de soya inoculados com *Fusarium* spp. **Fitopatologia Venezuelana**, Venezuela, v.4, p.40-43, 1991. Disponível em: <http://www.redpav-fpolar.ve/fitopato/v042/v042a30.html> Acesso em 21 ago. 2002.
30. SWANSON, T.A. & VAN GUNDY, S.D. Influences of temperature and plant age on differentiation of races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* on cowpea. **Plant Disease**, St. Paul, v.69, p.779-781, 1985.
31. THOMASON, I.J.; ERWIN, D.C. & GARBER, M.J. The relationship of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, to *Fusarium* wilt of cowpea. **Phytopathology**, St. Paul, v.49, p.602-606, 1959.

INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A
F. oxysporum f. sp. *tracheiphilum*
EM CAUPI: EFICIÊNCIA DE
INDUTORES ABIÓTICOS E
ATIVIDADE ENZIMÁTICA
ELICITADA



**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* EM
CAUPI: EFICIÊNCIA DE INDUTORES ABIÓTICOS E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA ELICITADA.**

**ANTONIA ALICE C. RODRIGUES^{1,2*}, EGÍDIO BEZERRA NETO³ & RILDO
SARTORI B. COELHO¹.**

¹Fitossanidade – Departamento de Agronomia – UFRPE, R. Dom Manuel de Medeiros,
S/N – Dois Irmãos, Recife/PE, 521710-900;

²UEMA – Laboratório de Fitopatologia, C.P.09, CEP 6500-970, São Luís-MA, Brasil,
e-mail: aacrodrigues@bol.com.br

³Departamento de Química- Laboratório de Bioquímica Vegetal - UFRPE, R. Dom
Manuel de Medeiros, S/N – Dois Irmãos, Recife/PE, 521710-900;

(Aceito para publicação em __/__/__)

Autor para correspondência: Antonia Alice C. Rodrigues

RESUMO

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E. & COELHO, R.S.B. Indução de
resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de
indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. Fitopatologia Brasileira, 2003.

Foram avaliados os efeitos de indutores abióticos em cultivares de caupi [*Vigna
unguiculata* (L.) Walp.] inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*
(E.F.Smith) Snyder & Hansen, quanto à severidade, controle da doença e atividade

enzimática. Para isso, plantas das cultivares IPA-206 e BR-17 Gurguéia com cinco dias de idade foram pulverizadas com soluções aquosas de ESM (5,0 mg do i.a.mL⁻¹), BABA (1,5 mM) e quitosana (2,0 mg.mL⁻¹), no primeiro par de folhas e inoculadas, aos sete dias, com 20 mL de uma suspensão de 1×10^6 conídios.mL⁻¹ do isolado ISO-PE. A avaliação da severidade da doença foi realizada 25 dias após germinação, através de escala de notas e índice de doença. As atividades das enzimas β -1,3-glucanase, peroxidase e fenilalanina amônia liase (PAL) foram determinadas em plantas submetidas aos tratamentos anteriores, coletadas aos cinco e 10 dias após inoculação. Foi observada diferença significativa entre os indutores e a testemunha, nas duas cultivares testadas, aos cinco e 10 dias, destacando-se o indutor ESM, proporcionando um controle da doença de 68,90 e 71,59 % nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, respectivamente. O indutor ESM apresentou melhores resultados nas atividades de β -1,3-glucanase, peroxidase e PAL, destacando-se na cultivar IPA-206 nos dois períodos analisados. Os indutores BABA e quitosana diferiram da testemunha, na atividade de PAL e β -1,3-glucanase, nessa mesma cultivar, aos cinco dias após a inoculação estando, também, envolvidos no processo de defesa de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*.

Palavras-chave: Murcha de *Fusarium*, β -1,3-glucanase, peroxidase, fenilalanina amônia liase e resistência sistêmica adquirida

ABSTRACT

Resistance induction to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in cowpea plants: effectiveness of abiotic inducers and elicited enzyme activity

The effect of abiotic inducers on cowpea cultivars inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (E. F. Smith) Snyder & Hansen were evaluated in relation to severity, disease control and enzyme activity. Aqueous solution of ESM (5,0 mg.mL⁻¹), BABA (1,5 mM) or chitosan (2,0 mg.mL⁻¹) was sprayed on the first pair of leaves of five days old cowpea plants, cultivar BR-17 Gurguéia and IPA-206. After seven days of elicitors application, inoculation was carried out with 20 mL of a 1×10^6 conidia.mL⁻¹ suspension prepared from ISO-PE isolate. Plants were harvested at five and 10 days after inoculation, and activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), β -1,3-glucanase and peroxidase analyzed. Significant difference between inducers and control was verified, mainly for ESM which provided a disease control of 68,9 % and 71,59 % for BR-17 Gurguéia and IPA-206 cultivars, respectively. ESM showed the best results related to β -1,3-glucanase, peroxidase and PAL activity, specially for the cultivar IPA-206 at both periods. BABA and chitosan differed from the control for PAL and β -1,3-glucanase activity on cultivar IPA-206, at five days after inoculation, contributing to defense process of cowpea to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*.

INTRODUÇÃO

Após a interação patógeno-hospedeiro, ocorre ativação do sistema de defesa da planta, por vários meios, resultando na produção de substâncias tóxicas aos patógenos, impedindo o estabelecimento destes. Alguns compostos produzidos pelas plantas possuem ação antimicrobiana, enquanto outros restringem o desenvolvimento de patógenos pela formação de barreiras estruturais (Kúc, 2001; Oliveira *et al.*, 2001).

1 A reação de defesa a determinados patógenos pode estar presente na planta,
2 adquirida por herança genética, tornando-as resistentes, ou podem ter os mecanismos
3 ativados através de indução, sendo, neste caso, denominada resistência sistêmica
4 adquirida (RSA), que se caracteriza pela capacidade da planta em adquirir um estado
5 geral de defesa após uma infecção inicial, podendo ser expressa no local do sítio de
6 infecção ou sistemicamente (Métraux, 2001).

7 A expressão de RSA tem sido observada com o uso de vários produtos químicos
8 ou abióticos, assim como o uso de microrganismos não patogênicos e condições de
9 estresse. Esse tipo de reação já foi estudado em vários patossistemas, envolvendo,
10 principalmente, hospedeiros como pepino (*Cucumis sativus* L.), *Arabidopsis thaliana*
11 (L.) Heynh. e fumo (*Nicotiana tabacum* L.), que servem de modelo de entendimento do
12 processo de resistência à infecção de vários patógenos (Hammerschmidt, 2001).

13 A RSA pode ser aumentada pelo uso de indutores abióticos, os quais ativam o
14 sistema de defesa das plantas, envolvendo várias etapas e rotas, potencializadas após
15 interação com o patógeno. Dentre os indutores mais utilizados, destacam-se o éster-S-
16 methyl (ESM) do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotiótico, ácido β -aminobutírico
17 (BABA) e quitosana (Benhamou *et al.*, 1998; Cole, 1999; Jakab *et al.*, 2001), porém,
18 apenas o ESM é liberado para uso comercial (Resende *et al.*, 2000).

19 O modo de ação dos indutores pode ocorrer de diferentes formas, sempre tendo
20 como fim a ativação do sistema de defesa das plantas. O ESM é um análogo do ácido
21 salicílico (AS), que age induzindo a ativação de genes que codificam PR-proteínas e
22 enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (Cole, 1999; Resende *et*
23 *al.*, 2000). Provavelmente, o BABA induz a produção de proteínas relacionadas com a
24 patogênese, como ocorre com o ESM (Jakab *et al.*, 2001), enquanto a ação da quitosana

1 poderá ser através de barreira estrutural, pela lignificação da parede celular, ou
2 possuindo efeito inibitório sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos (Benhamou *et*
3 *al.*, 1998).

4 Dentre as PR-proteínas ativadas pelos indutores encontram-se as hidrolases β -
5 1,3-glucanase e quitinase, que promovem a desorganização da parede celular dos
6 patógenos, e as peroxidases e fenilalanina amônia liase (PAL), que estão diretamente
7 envolvidas no processo de lignificação da parede celular (Oliveira *et al.*, 2001). Dann &
8 Deverall (2000) observaram a ativação da resistência sistêmica em ervilha (*Pisum*
9 *sativum* L.) a *Uromyces vicia-fabae* Schroet, quando plantas foram tratadas com altas
10 dosagens de ESM e isolados avirulentos de *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett)
11 Young, Dye & Wilkie, associadas ao aumento da atividade de β -1,3-glucanase e
12 peroxidase.

13 Em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], plântulas tratadas com ESM e
14 inoculadas com *Colletotrichum destructivum* O’Gara apresentaram aumento da
15 resistência, comprovada com o aumento das enzimas fenilalanina amônia liase e
16 chalcone isomerase (Latunde – Dada & Lucas, 2001).

17 Na interação caupi com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith)
18 Snyder & Hansen, não se sabe quais tipos de mecanismos estão envolvidos na ativação
19 da resistência sistêmica. Com base no exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a
20 atividade das enzimas β -1,3-glucanase, peroxidase e PAL em plantas de caupi induzidas
21 com ESM, BABA e quitosana, relacionando com a severidade da doença, através de
22 escala de notas e índice de doença, assim como a percentagem de controle da murcha de
23 fusário proporcionada por esses indutores.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de indutores em plantas de caupi inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

Os tratamentos constaram de um arranjo fatorial de 2x2x4, sendo duas cultivares, duas épocas de coleta das folhas e três indutores e a testemunha inoculada com o patógeno.

As cultivares de caupi, IPA-206, com padrão de resistência intermediária, e BR-17 Gurguéia, suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, foram semeadas em vasos plásticos, com capacidade de 3 dm³, contendo solo esterilizado com brometo de metila, mantendo-se cinco plantas/vaso.

Os indutores empregados foram: éster-S-metil (ESM), ácido β -aminobutírico (BABA) e quitosana, purificada de acordo com Benhamou *et al.* (1998). Estes foram aplicados por pulverização, no primeiro par de folhas aos cinco dias após a germinação. O ESM, formulado com 50 % do i.a. em grânulos (BION WG 50), obtido da Novartis Crop Protection Austrália, foi aplicado na concentração de 5,0 mg do i.a. mL⁻¹ de água. O BABA e quitosana, ambos da Sigma Chemical, foram aplicados, respectivamente, nas concentrações de 1,5 mM e 2 mg.mL⁻¹.

Aos sete dias após a germinação, foi realizada a inoculação, sendo utilizado um isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, obtido de planta de caupi infectada, proveniente do município de Floresta-PE (ISO-PE). Na produção do inóculo, o isolado conservado pelo método Castelani, foi repicado para placa de Petri contendo meio BDA e incubado à temperatura ambiente. Foi adicionado 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa e a superfície das colônias raspadas com lâminas de vidro. A suspensão

de conídios foi filtrada em gaze com dupla camada e ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹, com auxílio de câmara de Newbauer. Foi adotado o método de inoculação por ferimento na raiz, adicionando-se 20 mL da suspensão por planta.

As épocas de coleta foram aos cinco e 10 dias após a inoculação do patógeno, sendo utilizada uma planta para cada período de coleta. A severidade da doença foi avaliada 25 dias após germinação, utilizando-se três plantas, através de escala de notas de 1 a 9 (Schonhoven & Pastor-Corrales, 1987), índice de Mackinney (Balardin *et al.*, 1990) e percentagem de controle da doença.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo que cada unidade experimental composta de um vaso com três plantas. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SANEST, transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. A percentagem de controle foi calculada considerando cada tratamento em relação à respectiva testemunha.

Determinação da Atividade Enzimática

Preparação do extrato enzimático

Amostras de 1,0 g de folhas correspondentes a cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido com 1% (v/v) de polivinilpirrolidone (PVP) e 1,0 mL de tampão acetato de potássio (50 mM/ pH 5,0) contendo 1 mM EDTA. Os extratos foram centrifugados a 9000 g por cinco minutos a -4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos de Eppendorf e armazenado a -80°C (Dann & Deverall, 2000). Os sobrenadantes foram utilizados para avaliação da atividade de β -1,3-glucanase, peroxidase e teor de proteína solúvel.

Atividade de β -1,3-glucanase (E.C. 3.2.1.29)

A atividade de β -1,3-glucanase foi avaliada pela dosagem da glicose liberada com a hidrólise da laminarina (Tuzun *et al*, 1989). Para isto, pipetou-se para tubos de ensaio, 25 μ L do extrato enzimático, 200 μ L de tampão acetato de potássio (0,1 M/pH 4,8) e 200 μ L de laminarina (15 mg.mL⁻¹). Este material foi incubado a 37 °C por 30 minutos, e em seguida, acrescentou-se 1mL de reagente de Somogyi (Somogyi, 1952), mais 10 mL de água destilada e posto para agitar por 10 minutos. Após a agitação, o material foi aquecido a 100 °C por 15 minutos e resfriado em banho de gelo. Acrescentou-se 1,0 mL de reagente Nelson (Somogyi, 1952), 25 mL de água destilada e mantendo-se sob agitação por 15 minutos. Em seguida, foram realizadas leituras espectrofotométricas a 760 nm e comparadas com padrões de glicose. A curva padrão de glicose foi preparada como adição de padrão, da mesma forma das amostras, substituindo-se a laminarina por soluções de glicose (0 - 200 mg.L⁻¹).

Atividade da Peroxidase (E.C. 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase foi estimada com base na avaliação do Δ de absorbância proporcionado com oxidação do guaiacol (C₃H₈O₂) em presença do peróxido de hidrogênio (Dann & Deverall, 2000). Para o desenvolvimento da reação, pipetou-se para uma cubeta espectrofotométrica, 50 μ L de guaiacol (0,02 M), 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (0,38 M) e 2,0 mL de tampão fosfato (0,2 M/pH 5,8). Agitou-se levemente esta mistura, a qual serviu para zerar o espectrofotômetro. Em seguida, acrescentou-se 50 μ L do extrato enzimático, agitou-se suavemente e procedeu-se a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 470 nm, por um período de um minuto, com intervalo de 10 segundos.

1 Fenilalanina Amônia Liase (E.C. 4.3.1.5)

2 **Preparo do extrato** – pesou-se 1,0 g de folhas correspondente a cada tratamento,
3 transferiu-se para almofariz previamente resfriado, acrescentou-se 6,0 mL do tampão de
4 extração, a 4 °C, e macerou-se a mistura completamente, a qual foi centrifugada em
5 seguida a 6000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi diluído antes da análise da
6 atividade enzimática e da determinação da proteína solúvel, pipetando-se 200 µL do
7 mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração. Este foi preparado com uma
8 mistura de 22,2 g de Tris; 0,37 g de EDTA; 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP e
9 completou-se o volume para 1000 mL com água destilada, após ajustar o pH para 8,0
10 com ácido clorídrico 2,0 N.

11 **Determinação da atividade enzimática** – a atividade da PAL foi avaliada com base na
12 diferença de absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-
13 cinâmico (Hyodo *et al.*, 1978). Para isto, pipetou-se para tubos de ensaio, 1,5 mL de
14 cada extrato enzimático, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de
15 fenilalanina (49,6 mg.mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”. A mistura foi
16 incubada a 40 °C por uma hora, interrompendo-se a reação com banho de gelo e
17 procedendo-se as leituras espectrofotométricas a 290 nm

18 Determinação de Proteína Solúvel

19 O teor de proteína solúvel foi determinado colorimetricamente pelo método
20 descrito por Bradford (1976). Para esta determinação pipetou-se para tubos de ensaio,
21 200 µL do extrato enzimático, acrescentou-se 2,0 mL do reagente “coomassie brilliant
22 blue” (CBB), agitou-se suavemente cada tubo de ensaio e procedeu-se as leituras em
23 espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm. As leituras das amostras
24 correspondentes aos extratos enzimáticos foram convertidas em concentração de

1 proteína solúvel, por comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de
2 soro bovino (BSA) nas concentrações de 0; 25; 50; 100; 150 e 200 mg L⁻¹. O reagente
3 CBB foi preparado dissolvendo-se 0,10 g de “coomassie brilliant blue” G-250 em 50
4 mL de álcool etílico absoluto, em seguida acrescentando-se 100 mL de ácido
5 ortofosfórico (d=1,71 g.mL⁻¹) e 850 mL de água destilada.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8 Efeito de indutores em plantas de caupi inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. 9 *tracheiphilum*

10 Os resultados apresentados na Tabela 1 indicam que ocorreu ativação de
11 resistência sistêmica, mediada pelos indutores abióticos ESM, quitosana e BABA.

12 Na cultivar BR-17 Gurguéia, suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, foi
13 observada diferença significativa entre os indutores e a testemunha, não ocorrendo
14 diferença entre os indutores na escala de notas, apesar de que ESM apresentou menor
15 índice de doença seguido de quitosana e BABA. A cultivar IPA-206 apresentou
16 comportamento semelhante em relação à escala de notas, ocorrendo diferença
17 significativa entre indutores e a testemunha, e dentre os indutores ESM proporcionou
18 nota mais baixa, embora sem diferir significativamente dos demais indutores.

19 Comparando-se as testemunhas entre si, isto é, as plantas tratadas somente com
20 água destilada, verifica-se que apresentaram índice de doença 68,85 % e 66,04 % para
21 BR-17 Gurguéia e IPA-206, respectivamente, no período compreendido entre a
22 inoculação do patógeno e a avaliação. Embora, na época de avaliação, os índices de
23 doença observados tenham sido muito próximos, a expressão dos sintomas na cultivar
24 IPA-206 foi mais tardia que na BR-17 Gurguéia.

O uso de indutores proporcionou controle da murcha de fusário nas duas cultivares testadas, sendo que a cultivar BR-17 Gurguéia, suscetível à murcha de fusário, apresentou um controle de 68,90 %, enquanto a cultivar IPA-206, com resistência intermediária, apresentou 71,59 % de controle, quando tratadas com ESM com uma dosagem de 5,0 mg i.a.mL⁻¹ de água, cinco dias após germinação. Ativação da resistência em cultivares suscetíveis, também, foi observada por Dann & Deverall (2000) em ervilha, demonstrando menor percentagem de área foliar afetada por *U. viciae-fabae*, 1,5 % comparado a 9,39 % do controle, onde o ESM reduziu efetivamente a severidade da doença.

A ação do ESM como indutor de resistência tem sido comprovada em relação a diversas plantas cultivadas, envolvendo vários patossistemas, destacando-se entre estas o cacau (*Theobroma cacao* L.), cafeeiro (*Coffea arabica* L.), caupi e tomateiro (*Lycopersicon sculentum* Mill) (Benhamou & Bélanger, 1998; Guzzo *et al*, 2001; Resende *et al*, 2000; Rodrigues & Coelho, 2002;).

O indutor quitosana proporcionou o segundo maior controle da murcha de fusário, com 65,40 % para a cultivar BR-17 Gurguéia e 47,59 % para a cultivar IPA-206. É importante ressaltar que a maior percentagem de controle foi observada na cultivar de caupi com maior suscetibilidade ao patógeno, indicando que esse indutor possui a habilidade de elicitar a resposta de defesa natural da planta. Resultados semelhantes foram obtidos por Benhamou *et al*. (1994) no controle da murcha de fusário do tomateiro, através do tratamento de sementes com quitosana.

De acordo com a Safescience (2000), a indução de resistência mediada pelo quitosana ocorre pela ligação dessa molécula ao receptor, no hospedeiro, imitando um ataque fúngico, e a célula sensibilizada envia sinais ao núcleo, que elicita respostas

1 genéticas múltiplas e processos biológicos, que visam a inibição da infecção. Por outro
2 lado, supõe-se que essa molécula, devido a diferença de carga entre DNA (negativo) e
3 quitosana (positivo), se associa ao núcleo, ativando genes responsáveis pela defesa da
4 planta, conduzindo a uma resposta genética múltipla.

5 Dentre os indutores avaliados, o BABA foi o menos efetivo no controle da
6 murcha de fusário do caupi. Resultados obtidos por Zimmerli *et al.* (2001),
7 comprovaram que o tratamento de solo com BABA foi efetivo contra *Botrytis cinerea*
8 Pers. & Fr., causador do mofo cinzento em *Arabidopsis*, reduzindo a superfície da área
9 necrosada e a incidência da doença, quando comparada com a testemunha. A indução de
10 resistência pelo uso de BABA já foi comprovada em alguns patossistemas envolvendo
11 *Fusarium*, como tomateiro e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen e
12 milho (*Zea mays* L.) e *Fusarium moniliforme* Sheld (Jakab *et al.*, 2001), porém, este
13 pode ser o primeiro relato de uso do indutor ácido β -aminobutírico envolvendo caupi e
14 *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, uma vez que não foi encontrado na literatura
15 disponível outro relato semelhante, sendo comprovada a indução de resistência
16 sistêmica adquirida em plantas das cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, através da
17 avaliação da severidade da murcha de fusário.

18 Ainda não está claro o modo pelo qual o indutor BABA age, se é pela rota
19 metabólica dependente do ácido salicílico, induzindo a ação de genes relacionados com
20 as PR-proteínas ou se segue na rota do jasmonato/etileno, independente do ácido
21 salicílico, ou as duas vias. Porém, segundo Jakab *et al.* (2001), a proteção efetiva
22 conferida por esse indutor é devido a uma potencialização dos mecanismos de defesa
23 natural da planta contra o patógeno.

Em relação à altura das plantas não houve diferença significativa entre plantas tratadas e testemunha, assim como entre as cultivares. Isto indica que mesmo com o uso de produtos sistêmicos, que são translocados na planta, a morfologia desta não foi afetada, estando, em parte de acordo com o conceito amplo de indução de resistência a doenças, que é um fenômeno pelo qual as plantas exibem um aumento no nível de resistência, sem ocorrer mudanças na sua constituição genética básica (Siegrist *et al.*, 1997).

Efeito de indutores sobre a atividade enzimática.

β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanase, avaliada aos cinco dias após a inoculação com o patógeno, diferiu significativamente em resposta ao ESM, em ambas as cultivares, sendo este indutor o que proporcionou maior atividade desta enzima (Figura 1A).

Nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206 induzidas pelo ESM, a atividade desta enzima foi de 7,60 e 14,63 $\Delta ab_{760} \text{ min}^{-1} \text{ mg}$, respectivamente, cinco dias após inoculação. Quando a atividade enzimática foi avaliada 10 dias após inoculação do patógeno, a cultivar BR-17 Gurguéia também mostrou diferença significativa entre a testemunha e o indutor ESM. No entanto, a cultivar IPA-206 não apresentou diferença significativa entre a testemunha e quaisquer dos indutores. Aos 10 dias, a atividade da β -1,3-glucanase foi 7,98 e 4,21 $\Delta ab_{760} \text{ min}^{-1} \text{ mg}$, respectivamente, para BR-17 Gurguéia e IPA-206. Como se pode observar, na cultivar BR-17 Gurguéia, induzida pelo ESM, a atividade da β -1,3-glucanase permaneceu praticamente constante entre cinco e 10 dias. Este resultado sugere que após a ativação da resistência sistêmica adquirida em cultivares suscetíveis, pelo indutor ESM, essa PR-proteína permaneceu ativa na planta

1 por maior período de duração, proporcionando maior proteção contra *F. oxysporum* f.
2 sp. *tracheiphilum*.

3 Na cultivar IPA-206, com resistência intermediária ao patógeno, foi observado
4 um pico alto da enzima aos cinco dias após inoculação, seguido de queda significativa
5 aos 10 dias, indicando que a atividade dessa hidrolase não ocorreu de forma constante,
6 ou seja, a proteção conferida não foi duradoura, uma vez que não atinge todo o ciclo da
7 cultura.

8 A relação entre resistência sistêmica e hidrolases, como β -1,3-glucanase e
9 quitinase, sempre esteve baseada no fato de que β -1,3-glucana e quitina são os maiores
10 componentes da parede celular de muitos fungos e que essas enzimas podem hidrolizar
11 a parede celular desses patógenos *in vitro*, mesmo em oomicetos. Tuzun *et al.* (1989)
12 observaram correlação positiva entre indução de resistência a *P. parasitica* em fumo e
13 ativação de β -1,3-glucanase, sugerindo que plantas induzidas ficam sensibilizadas e
14 respondem mais rapidamente que plantas controle e, que β -1,3-glucanase é um
15 componente da resposta de defesa da planta por restringir o desenvolvimento do
16 patógeno no tecido foliar.

17 Na ativação da resistência sistêmica adquirida, a formação de PR-proteínas estão
18 envolvidas em rota de transdução de sinais, dependente do ácido salicílico para a
19 expressão do gene chave NPR1. Nesse caso, análogos do ácido salicílico como ESM
20 podem entrar nessa rota do metabolismo das plantas, induzindo a resistência sistêmica e,
21 segundo Métraux (2001) esse indutor pode ter função dupla nessa rota, tanto induzindo
22 diretamente ou potencializando genes envolvidos na reação de defesa da planta.

23 Foi observado um efeito menor dos indutores BABA e quitosana na ativação de
24 β -1,3-glucanase, quando comparado com ESM, embora, aos cinco dias após inoculação

a atividade enzimática tenha sido maior que a detectada aos 10 dias, não diferindo estatisticamente da testemunha, nas cultivares testadas. De acordo com os resultados, a proteção conferida por esses indutores ocorre logo após a inoculação, no pico da ativação da enzima, decrescendo em seguida. A atividade de β -1,3-glucanase foi detectada em raízes de tomateiro, tratadas com esse indutor e inoculadas com *Fusarium* (Benhamou *et al*, 1994).

Peroxidase

Aos cinco dias após a inoculação com o patógeno, a atividade da peroxidase aumentou apenas na cultivar IPA-206, como efeito do ESM (Figura 1B). No entanto, aos 10 dias, este efeito foi verificado tanto na cultivar IPA-206 como na BR-17 Gurguéia, em resposta ao mesmo indutor. A cultivar IPA-206, com resistência intermediária ao patógeno, quando tratada com ESM, apresentou atividade enzimática de 12,71 e 9,42 Δ ab₄₇₀ min⁻¹.mg, respectivamente aos cinco e 10 dias após a inoculação. Com o indutor BABA ocorreu o inverso, isto é, a atividade da peroxidase foi menor aos 10 dias do que aos cinco dias após a inoculação em ambas as cultivares, embora não tenha diferido significativamente da testemunha. Este resultado suporta a hipótese de que este não é o mecanismo pelo qual esse indutor ativa a resistência em caupi.

Esses resultados estão de acordo com Oliveira *et al.*(2001), que estudaram o comportamento de genótipos de caupi resistentes e suscetíveis à antracnose e meloidoginose quanto a produção de peroxidase e observaram que a cultivar TE97-411-1E resistente a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, apresentou um aumento significativo da atividade peroxidásica em resposta a infecção, sugerindo a participação dessa enzima no mecanismo de defesa das plantas.

1 Apesar de ter ocorrido queda de atividade da peroxidase, 10 dias após
2 inoculação, na cultivar IPA-206, tratada com ESM, indica que ocorreu ativação da
3 resistência adquirida, fato observado, também, na ação do indutor quitosana. Porém, o
4 indutor BABA apresentou efeito inverso, uma vez que conduziu uma ligeira atividade
5 de peroxidase aos cinco dias, seguido de queda de produção aos 10 dias após a
6 inoculação, sugerindo que, provavelmente, esse não é o mecanismo pelo qual esse
7 indutor ativa a resistência sistêmica em caupi.

8 Diversos autores relacionaram a atividade da peroxidase em feijoeiro (*Phaseolus*
9 *vulgaris* L.) com a resistência sistêmica. Siegrist *et al.* (1997) verificaram a alta
10 produção enzimática $23,80 \Delta ab_{470} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}$ em fluídos intercelulares de folhas de
11 feijoeiro comum comparado com $8,0 \Delta ab_{470} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg}$ no controle, induzidos com ESM
12 e inoculados com *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. A resistência relaciona-se,
13 provavelmente, ao fato do patógeno crescer no apoplasto, onde ocorre a atividade
14 enzimática. Xue *et al.* (1998) usaram isolados de *Rhizoctonia* binucleada (NBS) não
15 patogênica como indutor e detectaram aumento da atividade de peroxidase em tecido de
16 feijoeiro não inoculado, conferindo proteção contra *Rhizoctonia solani* Kühn e
17 *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.). Dann & Deverall (2000)
18 constataram uma proteção local de peroxidase em feijoeiro seis dias após indução com
19 *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sacketti) a *M. pinodes*, porém, essa proteção não
20 ocorreu sistemicamente.

21 A proteção prolongada por peroxidase, conferida por ESM, também foi relatada
22 por Cavalcanti (2000), em cacau, contra *Verticillium dahliae* Kleb, sendo detectada em
23 um nível mais alto por período de tempo mais longo. Fernandes (1998) selecionou a
24 cultivar Vita-3 de caupi pela maior produção constitutiva de duas peroxidases (catiônica

e aniônica) e observou aumento da atividade enzimática, após tratamento com ácido salicílico, principalmente, da peroxidase aniônica e, sugere que essa enzima pode estar relacionada com a resistência das plantas.

A atividade peroxidásica a partir da indução advém de uma seqüência de eventos e sinais, partindo de uma isoforma pré-existente, catalizando o último passo enzimático da biossíntese da lignina, servindo como barreira ao patógeno, ou mesmo interagindo com a quitina da parede celular de muitos fungos atuando conjuntamente com β -1,3-glucanase (Fernandes, 1998; Khairullin *et al.*, 1997)

Fenilalanina Amônia Liase

Aos cinco dias após inoculação, a atividade da PAL na cultivar BR-17 Gurguéia não diferiu estatisticamente entre testemunha e indutores, enquanto que na cultivar IPA-206, o ESM proporcionou aumento na atividade desta enzima (Figura 1C). Aos 10 dias após inoculação, apenas ESM mostrou efeito significativo sobre a ativação da PAL, em ambas as cultivares. Na BR-17 Gurguéia ocorreu pequeno aumento na atividade da PAL, do quinto ao décimo dia após a inoculação, ao contrário do que ocorreu com os demais indutores. A atividade da PAL elicitada por ESM aos 10 dias após inoculação foi de 1,49 e 1,99 $\Delta\text{ab}_{290} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}$, respectivamente, para IPA-206 e BR-17 Gurguéia.

A atividade da PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos propanóides, com participação da fenilalanina e sua conversão em ácido-transcinâmico, catalizada pela PAL, resultando em alguns compostos como flavonóides, fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (Nakazawa *et al.*, 2001). A baixa atividade encontrada em caupi, pode estar relacionada com a época de realização da avaliação, sendo que o intervalo entre a inoculação e o

1 preparo do extrato foliar pode ter sido longo e o pico enzimático ter ocorrido em um
2 prazo mais curto, apesar de tratar-se de um patógeno vascular. Na avaliação da
3 atividade dessa enzima, Latunde-Dada & Lucas (2001) detectaram a maior atividade em
4 hipocótilo da cultivar de caupi IT82E-60, 18 horas após a inoculação com *C.*
5 *destructivum*, decrescendo rapidamente, em seguida.

6 Também foi confirmado por outros autores, que mesmo a ativação da PAL
7 sendo realizada por outros fatores, como fermento (Saltveit, 2000) ou luz (Chen *et al*,
8 2002), o pico da atividade enzimática ocorre entre 24 a 48 horas no máximo após a
9 indução. E a antecipação do pico dessa enzima, provavelmente, pode estar relacionada
10 com a sua função no início da rota biossintética da lignina.

11 **Efeito de indutores abióticos na atividade de β -1,3-glucanase e índice da doença** 12 **murcha de fusário em caupi.**

13 Foi observada correlação inversa entre a ação dos indutores na atividade da β -
14 1,3-glucanase, aos cinco dias após a inoculação, e o índice de doenças em ambas as
15 cultivares de caupi (Figura 2). Enquanto os índices de doença aumentaram com a
16 seqüência ESM, quitosana e BABA, testemunha, a atividade da β -1,3-glucanase
17 diminuiu nesta seqüência de tratamentos, confirmando a ação dos indutores no controle
18 da doença, inclusive com maior eficácia para o ESM. A comparação com β -1,3-
19 glucanase, deve-se ao fato desta PR-proteína estar diretamente relacionada com a
20 redução da severidade das doenças.

21 O indutor ESM proporcionou menor índice de doença nas cultivares BR-17
22 Gurguéia e IPA-206, respectivamente, com 21,41 e 18,76 %, correspondendo, também,
23 a maior indução de produção enzimática nas duas cultivares, com 7,60 e 14,63 Δab_{760}
24 $min^{-1}.mg$, respectivamente, diferindo significativamente das testemunhas. Os indutores

1 BABA e quitosana induziram maiores índices de doença, em relação ao ESM, porém
2 menor em relação a testemunha, apesar de não diferirem estatisticamente e,
3 conseqüentemente, menores atividades de β -1,3-glucanase, provavelmente, pelo fato
4 desses indutores atuarem na resistência sistêmica adquirida, desencadeando outros
5 mecanismos, não necessariamente, as PR-proteínas.

6 A relação entre a ação do indutor ESM na redução da severidade associada com
7 a produção de PR-proteínas foi demonstrado por Dann & Deverall (2000) em ervilha,
8 contra o patógeno *M. pinodes*, minimizando a doença e aumentando a atividade de β -
9 1,3-glucanase e quitinase, confirmando o envolvimento dessas enzimas na resistência
10 sistêmica adquirida. Tuzun *et al.* (1989) observaram que plantas previamente injetadas
11 com esporângios de *Peronospora tabacina* D.B. Adan foram protegidas após
12 subsequente inoculação com o patógeno, promovendo um controle de até 95 % da
13 doença, relacionado com o aumento da atividade de β -1,3-glucanase entre dois e seis
14 dias após a indução.

15 O uso de indutores permitiu a redução da severidade da murcha de fusário em
16 caupi, principalmente, o indutor ESM, que desencadeou a produção de PR-proteína β -
17 1,3-glucanase, como mecanismo bioquímico da resistência sistêmica adquirida,
18 podendo ser usado como estratégia no manejo da cultura do caupi.

20 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 21
22 BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. & OTOYA, M.M. Resistência de
23 germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Fusarium oxysporum* f. sp.
24 *phaseoli*. Fitopatologia Brasileira 17:102-103. 1990.

1 BENHAMOU, N. & BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance
2 to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiology
3 118:1203-1212. 1998.

4
5 BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P.J. & NICOLE, M. Induction of systemic
6 resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with
7 chitosan. Phytopathology 84:1432-1444. 1994.

8
9 BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of resistance against
10 *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial
11 strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. Planta 204:153-168.
12 1998.

13
14 BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
15 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical
16 Biochemistry 72:248-254. 1976.

17
18 CAVALCANTI, L.S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas
19 de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Theobroma, por benzothiadiazole (BTH).
20 (Tese de Mestrado). Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2000.

21
22 CHEN, Y.; SHIN, J. & LIU, Z. Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in
23 mungbean hypocotyls. Plant Physiology and Biochemistry 40:33-39. 2002.

24

1 COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired
2 resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. *Crop Protection*
3 18:267-273. 1999.

4
5 DANN, E.K. & DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by
6 an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot
7 pathogen. *Plant Pathology* 49:324-332. 2000.

8
9 FERNANDES, C.F. Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-
10 corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Vita 3.(Tese de Mestrado). Fortaleza.
11 Universidade Federal do Ceará. 1998.

12
13 GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K. & MARTINS, E.M.F. Ação protetora do
14 Acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivo do*
15 *Instituto Biológico* 68:89-94. 2001.

16
17 HAMMERSCHMIDT, R. Cytological and biochemical aspects of the induced
18 resistance response of cucumber to fungal pathogens. *Resumos, XXIV Congresso*
19 *Brasileiro de Fitopatologia*, São Pedro, SP. 2001. pp. 253-254.

20
21 HYODO, H.; KURODA, H. & YANG, S.F. Induction of phenylalanine ammonia-lyase
22 and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet
23 spotting caused by ethylene. *Plant Physiology* 62:31-35. 1978.

24

- JAKAB, G.; COTTIER, V.; TOQUIN, V.; RIGOLI, G.; ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J.P. & MAUCH-MANI, B. β -aminobutyric acid-induced in plants. European Journal of Plant Pathology 107:29-37. 2001.
- KHAIRULLIN, R.M.; MAKSIMOV, I.V.; JUSUPOVA, Z.R.; AKHMETOVA, I.E. & ISAEV, R.F. The direct and WGA-enhance coupling of wheat peroxidase to chitin. European Journal of Cell Biology 74:17. 1997 (Abstract).
- KÚC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology 107:7-12. 2001.
- LATUNDE-DADA, A.O. & LUCAS, J.A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. Physiological and Molecular Plant Pathology 58:199-208. 2001.
- MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. European Journal of Plant Pathology 107:13-18. 2001.
- NAKAZAWA, A.; NOZUE, M. & YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. Journal of Plant Research 114:323-328. 2001.

OLIVEIRA, J.T.A.; ANDRADE, N.C.; MIRANDA, A.S.M.; BARRETO, A.L.H.;
MELO, V.M.M.; FERNANDES, C.F.; VASCONCELOS, I.M.; SILVEIRA,
J.A.G; CAVALCANTI, F.R.; FREIRE-FILHO, F.R.; FREIRE, F.C.O. &
GONÇALVES, F.J.T. Atividades peroxidásica e β -1,3 glucanásica elicitadas por
agentes bióticos causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda
[*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Anais, V Reunião Nacional de pesquisa de Caupi-
V RENAC, Teresina, PI. 2001 pp. 19-23.

RESENDE, M.L.; NOJOSA, J.B.A.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; NIELLA,
G.R.; CARVALHO, G.A.; GIOVANNI, G. & CASTRO, M.C. Perspectivas da
indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis pernicioso* através do
benzotiadiazole (BTH). Fitopatologia Brasileira 25:149-156. 2000.

RODRIGUES, A.A.C. & COELHO, RS.B. Efeito de dosagens e épocas de aplicação de
acibenzolar-S-methyl em plantas de caupi na indução de resistência a *Fusarium*
oxysporum f. sp. *tracheiphilum*. Resumos, XXV Congresso Brasileiro de
Fitopatologia, Recife, PE. 2002. p. 157.

SAFESCIENCE. Mode of action and elicitation of plant defense responses. 2000.
Disponível em: <<http://www.safescience.com/agriculture/elexamoti.html>>.
Acesso em: 09 dez. 2001.

SALTVEIT, M.E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning
are altered by heat shock. Postharvest Biology and Technology 21:61-69. 2000.

- 1 SCHOONHOVEN, A.V. & PASTOR-CORRALES, M.A. Standard system for the
2 evaluation of beans germplasm. Cali. Centro International de Agricultura Tropical
3 – CIAT. 1987.
4
- 5 SIEGRIST, J.; GLENEWINKEL, D.; KOLLE, C. & SCHIMIDTKE, M. Chemically
6 induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. Journal
7 of Plant Disease and Protection 104:599-610. 1997.
8
- 9 SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. Journal of Biology and Biochemistry
10 195:19-23. 1952.
11
- 12 TUZUN, S.; RAO, N.M.; VOGELI, U.; SCHARDL, C.L. & KÚC, J. Induced systemic
13 resistance to blue mold: early induction and accumulation of β -1,3-glucanase,
14 chitinase, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized
15 tobacco. Physiology and Biochemistry 79:979-983. 1989.
16
- 17 XUE, L.; CHAREST, P.M. & JABAJI-HARE, H. Systemic induction of peroxidase,
18 1,3- β -glucanase, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species.
19 Phytopathology 88:359-365. 1998.
20
- 21 ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J.P. & MAUCH-MANI β -aminobutyric acid-induced
22 protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. Plant
23 Physiology 126:517-523. 2001.
24

TABELA 1. Severidade da murcha de fusário em plantas de caupi, tratadas com indutores abióticos, através de escala de notas e índice de doença e o efeito sobre a percentagem de controle e altura das plantas, 25 dias após a germinação

CULTIVAR	INDUTOR	ESCALA DE NOTA	ÍNDICE DE DOENÇA (%)	PERCENTAGEM DE CONTROLE (%)	ALTURA (cm)
BR - 17 Gurguéia	ESM	1,91b	21,41 b	68,90	22,36 a
	Quitosana	2,18 b	23,82 b	65,40	23,50 a
	BABA	2,71 b	29,57 b	57,05	20,34 a
	Testemunha	6,20 a	68,85 a	-	20,76 a
IPA-206	ESM	1,72 b	18,76 b	71,59	21,17 a
	Quitosana	3,14 b	34,61 b	47,59	19,75 a
	BABA	3,18 b	35,00 b	47,00	20,20 a
	Testemunha	6,09 a	66,04 a	-	20,24 a
CV (%)		20,72	24,55		17,48

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

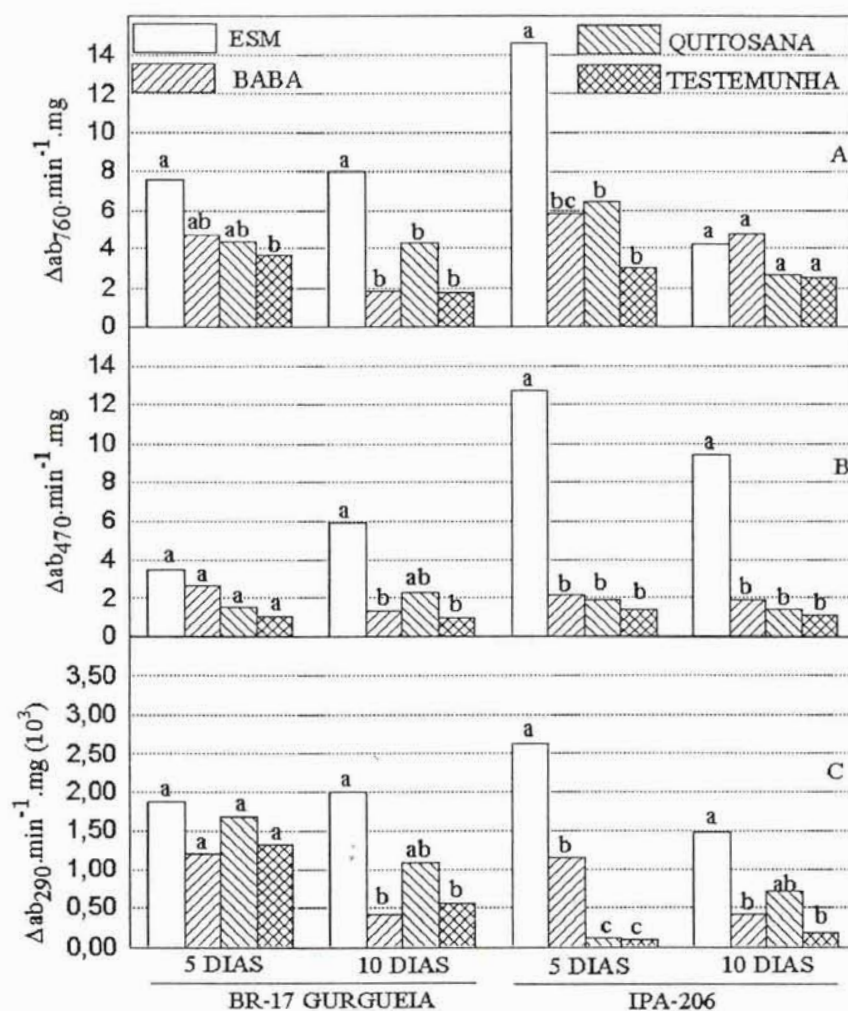
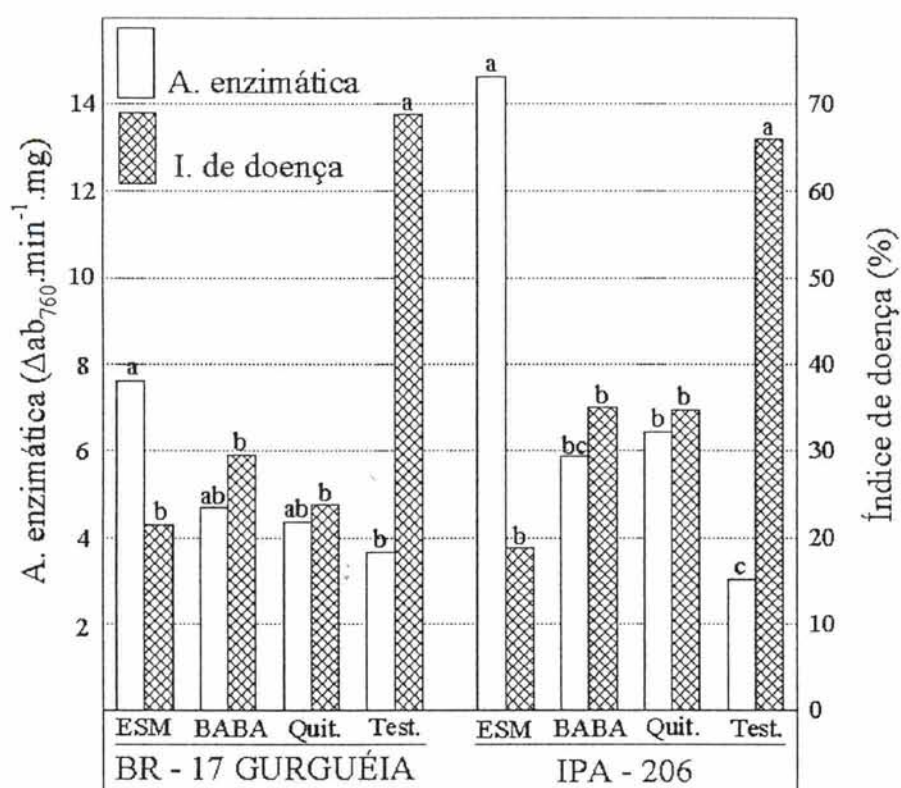


FIG. 1. Atividade de β -1,3-glucanase (1A), peroxidase (1B) e PAL (1C), em cultivares de caupi induzidas com ESM, BABA e quitosana, aos cinco e 10 dias após a inoculação com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Médias seguidas por letras distintas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 16,28; 26,96 e 16,11 %, respectivamente.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 **FIG. 2.** Efeito dos indutores ESM, BABA e quitosana na produção de β -1,3
20 glucanase, cinco dias após a inoculação com *F. oxysporum* f. sp.
21 *tracheiphilum*, no controle da murcha de fusário em caupi. Médias
22 seguidas por letras distintas diferem significativamente entre pelo teste
23 de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. CV = 24,55 %

MECANISMOS ESTRUTURAIS E
ANÁLISE FUNCIONAL DO
XILEMA ENVOLVIDOS NA
ATIVACÃO DE RESPOSTAS DE
DEFESA DE CAUPI [*Vigna*
unguiculata (L.) Walp.] A
Fusarium oxysporum f. sp.
tracheiphilum



**MECANISMOS ESTRUTURAIS E ANÁLISE FUNCIONAL DO XILEMA ENVOLVIDOS
NA ATIVAÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA DE CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] A
Fusarium oxysporum f. sp. *tracheiphilum*.**

Antonia Alice C. Rodrigues¹

Rejane Pimentel²;

Rildo Sartori B. Coelho³,

Christina Alves. Peixoto⁴,

Fábia Cristiane. M. L. de Lira⁴

Elizângela S. F. Dias⁴

Recebido em _/_/_ - Aceito em _/_/_

RESUMO – Foram avaliados os efeitos dos indutores abióticos sobre o mecanismo estrutural de defesa e a funcionalidade das células do xilema de caupi *Vigna unguiculata* (L.) Wap., aos 17 e 25 dias após germinação. Soluções ESM (5,0 mg i.a.mL⁻¹), BABA (1,5 mM) e quitosana (2,0 mg.mL⁻¹) foram pulverizadas no primeiro par de folhas das cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, cinco dias após germinação. A inoculação de conídios do isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, em suspensão, foi realizada em raízes após fermento. A determinação qualitativa da lignina foi realizada em cortes transversais de raízes corados com Etzold. Alterações na estrutura do xilema foram avaliadas através da medição do diâmetro dos dez maiores vasos de xilema do feixe vascular radicular. A condutância hidráulica foi calculada a partir dos valores do diâmetro de todos os maiores vasos xilemáticos do feixe vascular radicular. A funcionalidade do xilema foi afetada pelos indutores, sendo o indutor ESM aquele que permitiu maior desenvolvimento do diâmetro dos vasos e, conseqüentemente, maior condutância hidráulica radicular nos cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, aos 17 dias. O indutor quitosana apresentou efeito semelhante na cultivar BR-17 Gurguéia, aos 25 dias.

Palavras-chave - murcha de *Fusarium*, indutores, histologia

¹Fitossanidade-Departamento de Agronomia-UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, S/N. Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife/PE, Brasil.

² Departamento de. Biologia-Área de Botânica-UFRPE, R. Dom Manoel de Medeiros, S/N. Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife/PE, Brasil

³ Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA. Sede, CEP 50761-000, Recife, PE, Brasil

⁴ Departamento de Patologia e Biologia Celular-Centro de Pesquisa Ageu Magalhães-FIOCRUZ. Recife/PE, Brasil.

ABSTRACT- The effects of abiotic inductors over the structural defense mechanism and cell functionality of the xylem from caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Wap.), were evaluated 17 and 25 days after germination were evaluated. ESM (5,0 mg i.a.mL⁻¹), BABA (1,5 mM) on quitosan (2,0 mg.mL⁻¹) solutions were sprayed on the first two leaves from the cultivars BR-17 Gurguéia and IPA-206, five days after germination. The conidia inoculation with the isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, in suspension, was carried out on roots after wound. The qualitative determination of lignin was done in cross-section of stained roots with Etzold. Structure's alterations in the xylem were done through the measure of the diameter from the ten greatest vases. The hydraulic conductance was calculated through the measure of the diameter from the all-greatest vases of xylem of the root vascular bundle. The xylem functionality was affected by the inductors. ESM permitted the greatest diameter development of the vases and, consequently, greatest root hydraulic conductance in the cultivars BR-17 Gurguéia and IPA-206, after 17 days. The inductor chitosan showed similar effect in the cultivars BR-17 Gurguéia, after 25 days.

Key words – *Fusarium* wilt, inductors, histology

Introdução

A interação incompatível entre o hospedeiro e o patógeno é associada com uma série de eventos envolvidos na resposta de defesa, incluindo reação de hipersensibilidade, respostas bioquímicas e barreiras estruturais, como a formação de lignina, sendo esses mecanismos desenvolvidos pelas plantas para se defenderem contra ataques de patógenos (Dixon & Harrison 1994).

A barreira estrutural é um mecanismo de resistência estudado por muitos pesquisadores, com comprovação efetiva através de mudanças ultraestruturais do hospedeiro a vários patógenos (Brammal & Higgins, 1988; Xuei *et al.* 1988; Trillas *et al.* 2000), denominada de lignificação, que do ponto de vista funcional confere maior resistência à parede celular, facilitando o transporte de água, impedindo a degradação dos polissacarídeos que compõem a parede celular e agindo como uma linha de defesa contra o avanço de patógenos (Halfield & Vermerris, 2001).

A enzima fenilalanina amônia liase (PAL) é importante na biossíntese desse polímero, responsável pela conversão do ácido transcinâmico, uma rota intermediária chave na produção de lignina ou de ácido salicílico, que dependendo do patossistema envolvido, pode ser desencadeada a resistência local ou sistêmica, respectivamente (Keller *et al.* 1996; Redman *et al.* 1999). Porém, esse

evento não é restrito somente a interações que obedecem à teoria gene-a-gene, mas também em plantas suscetíveis através da indução da resistência sistêmica adquirida (Sticher *et al.* 1997).

A resistência de plantas pode ser desencadeada por indutores abióticos como éster-S-metil (ESM) do ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotiótico (Cole, 1999), ácido - β -aminobutírico BABA (Jakab *et al.*, 2001) e quitosana (Benhamou *et al.* 1998). Esses indutores agem através de mecanismos e rotas diferenciadas, porém, associados com o aumento da capacidade de uma resposta rápida e efetiva de defesa celular, ativadas apenas após o contato com o patógeno, não apenas no local de aplicação dos produtos, mas também em partes da planta distantes do local tratado (Conrath *et al.* 2002).

O mecanismo de defesa estrutural tem sido freqüentemente e principalmente caracterizado pela determinação qualitativa da lignina, como em meloeiro (*Cucumis melo* L.) em relação a *Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx. e *F. oxysporum* (Redman *et al.* 1999). Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill), *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* Jarvis & Shoemaker teve ação inibida através da formação de uma barreira estrutural, reduzindo colonização dos tecidos vasculares, induzida pelo uso de ESM (Benhamou & Bélanger 1998), sendo anteriormente constatado esse mesmo tipo de resposta, mediada pelo indutor quitosana (Benhamou 1992).

O modo de ação dos indutores não ocorre diretamente sobre o patógeno, uma vez que induz a defesa das plantas através de seus próprios processos biológicos (Lyon & Newton 1997). Em geral, o transporte de água e nutrientes do solo por um volume de fluxo, sob pressão negativa para o interior das plantas, assume importância fundamental quanto à condução hidráulica nas células do xilema (Hacke & Sperry 2001), associado ao suporte mecânico fornecido às mesmas (Joyce & Steiner 1995).

O movimento de água das raízes para a atmosfera é controlado pela condutividade da água, que pode ser mais ou menos rápida e reversível para se adaptar a uma mudança nas condições ambientais ou a uma situação de estresse (Schubert *et al.* 1999). Para Zimmerman *et al.* (1993), nesse movimento de água, mediado pelo xilema, estão envolvidas várias forças responsáveis pelo transporte à longa distância, como tensão, pressão osmótica, capilaridade e força interfacial entre água e ar.

Dependendo do tipo de estresse imposto à planta, podem ocorrer alterações no xilema, afetando sua eficiência na condução de água. A salinidade do solo é um dos tipos de estresse mais comumente relatado. Salomon *et al.* (1986) observaram que a salinidade induz mudanças anatômicas e morfológicas em raízes de ervilha (*Pisum sativum* L.), causando constrição e curvatura do ápice das raízes, afetando a diferenciação celular, diminuindo o tamanho das células e a atividade mitótica. Em sorgo (*Sorghum bicolor* L.), ocorreu estreitamento do proto e metaxilema, diminuindo o fluxo de água na área da superfície foliar (Baum *et al.*, 2000). Algumas cultivares de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], apesar de mostrarem tolerância moderada à salinidade, têm apresentado reações como redução

de área foliar e danos à membrana celular após tratamento com altas concentrações de NaCl (Freitas *et al.* 2001; Dantas *et al.* 2001).

A taxa de fluxo de água no interior das células de xilema é determinada pela condutância hidráulica, considerando componentes específicos no transporte e movimento da água, como o diâmetro destas células, informando acerca da relação entre sua estrutura e função (Gibson *et al.* 1984; Linton & Nobel 1999).

Baseado nesse contexto, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito dos indutores ESM, BABA e quitosana na defesa estrutural de caupi ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F.Smith) Snyder & Hansen, através da análise qualitativa da lignina e variações nas dimensões dos elementos condutores do xilema, alterando a funcionalidade na condução da água no interior de suas raízes.

Material e métodos

Aplicação de indutores em plantas de caupi inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* - As cultivares de feijão caupi, IPA-206, com padrão de resistência intermediária, e BR-17 Gurguéia, suscetível a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Albuquerque *et al.* 2001), foram semeadas e cultivadas em vasos plásticos, com capacidade de 3 dm³, contendo solo esterilizado com brometo de metila, mantendo-se quatro plantas/vaso.

Foram utilizadas soluções aquosas dos indutores ESM, formulado com 50 % do i.a. em grânulos (BION WG 50) obtido da Novartis Crop Protection Austrália, na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ de água, ácido β -aminobutírico (BABA) (Sigma Chemical) a 1,5 mM e quitosana, (Sigma Chemical) purificada de acordo com Benhamou *et al.* (1998) a 2,0 mg.mL⁻¹. Todos os indutores foram pulverizados no primeiro par de folhas emitido, cinco dias após germinação.

Na produção do inóculo, o isolado ISO-PE de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, obtido de planta de caupi infectada, proveniente do Município de Floresta-PE, foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA e incubado à temperatura ambiente. Após sete dias, foram adicionados 20 mL de água destilada e esterilizada, em cada placa, sendo a superfície das colônias raspada com lâminas de vidro. A suspensão de conídios foi filtrada em gaze com dupla camada e ajustada para 1x10⁶ conídios.mL⁻¹, com auxílio de câmara de Neubauer. Foi adotado o método de inoculação por ferimento na raiz, adicionando-se 20 mL da suspensão por planta, sete dias após germinação.

A avaliação das plantas foi realizada 17 e 25 dias após germinação, através da determinação qualitativa da lignina e avaliação da capacidade funcional do xilema de raízes das plantas de caupi, sendo coletadas duas plantas por análise, em cada época de avaliação.

Determinação qualitativa da lignina em cortes histológicos de raízes de caupi induzidas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* - O estudo foi efetuado em cortes transversais na região subapical das raízes de cultivares de caupi IPA-206 e BR-17 Gurguéia. Todas as plantas foram previamente tratadas com indutores químicos, conforme descrição anterior. A coleta do material foi realizada aos 17 e 25 dias após germinação, através de cortes transversais da porção subapical de raízes.

O material vegetal foi colocado em tubos de Eppendorf como fixador FAA 95% (50 mL de etanol a 95%, 5 mL de ácido acético, 10 mL de formol e 35 mL de água destilada), por 24 horas, segundo Santos (2001). Em seguida, todo o material foi tratado seguindo metodologia de Johansen (1940). Os cortes histológicos foram corados com azul de astra, fucsina básica e safranina (Etzold), segundo Krauter (1985).

Fotomicrografias foram obtidas utilizando-se microscópio ótico (Zeiss Axiophot, West Germany e Olympus B071) acoplado com câmera fotográfica Olympus (PMC35B).

Análise estrutural do xilema e raízes de caupi induzidas e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* - A partir da coleta, efetuada 17 e 25 dias após germinação, foi seguida a mesma metodologia anterior para a confecção de lâminas histológicas semipermanentes.

A avaliação da capacidade condutora do xilema foi obtida através da determinação do número dos maiores elementos de vaso do xilema presentes no feixe vascular e medição do diâmetro interno dos seus dez maiores vasos, com quatro repetições (Arnold & Mauseth 1999). A partir dos valores de diâmetro hidráulico foram calculados os valores de condutância hidráulica segundo Martre *et al.* (2000).

Análise Estatística - O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com arranjo em fatorial 2 x 2 x 4, sendo duas cultivares, duas épocas de avaliação e quatro tratamentos, incluindo a testemunha, inoculada somente com o patógeno, com quatro repetições.

Os dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 1995), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Resultados e discussão

Efeito dos indutores abióticos sobre os mecanismos estruturais envolvidos na resistência de cultivares de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. - A análise histológica do tecido das raízes de plantas de caupi, tratadas com os indutores ESM, BABA e quitosana e inoculadas com o patógeno

F. oxysporum f. sp. *tracheiphilum* mostrou que os indutores ESM e BABA não exerceram efeito sobre lignificação da parede celular das cultivares de caupi BR-17 Gurguéia e IPA-206.

O indutor quitosana estimulou a resistência das cultivares ao patógeno, detectada através de maior deposição de lignina na parede dos vasos xilemáticos em ambas as cultivares (Fig. 1).

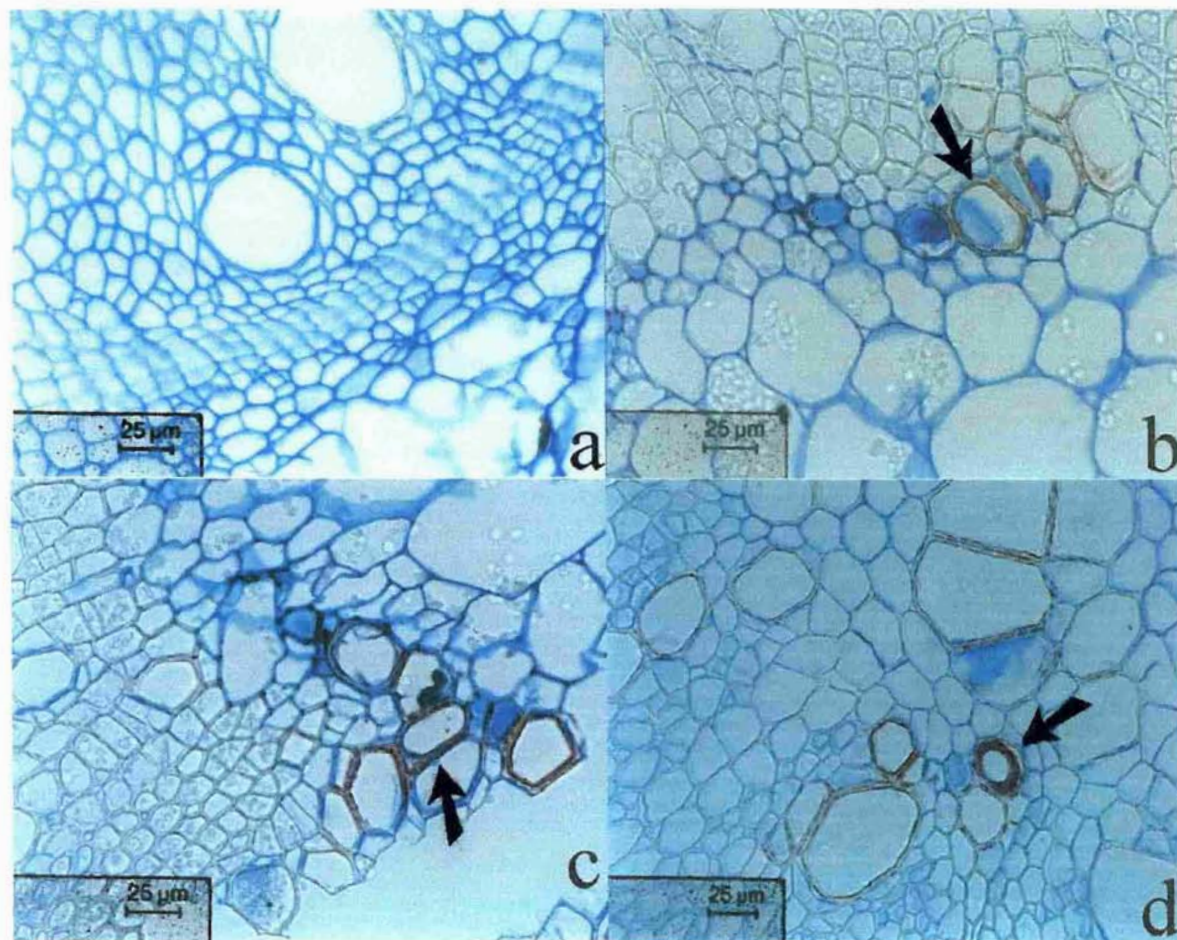


Figura 1. Detalhes do xilema lignificado de cultivares de caupi, após indução com quitosana e inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*: testemunha (a); células do xilema do cultivar BR-17 Gurguéia (b,c); e cultivar IPA-206 (d),. apresentando lignificação do vaso do xilema (seta)

A determinação qualitativa da lignina foi detectada através da coloração vermelha nas paredes celulares dos elementos xilemáticos pelo Etzold. A cor vermelha, observada no xilema, resultou da reação dos álcoois, como o cinamaldeído, com a safranina, sendo a coloração resultante da clorinação da lignina e, conseqüentemente, no desenvolvimento de uma cor vermelha com sulfito de sódio (Jensen 1962; Vance 1980). Este é um método adotado rotineiramente, principalmente, para detecção de células lignificadas do xilema (Chen *et al.* 2002). Embora seja comum observar diferenças na tonalidade da cor vermelha, não é possível mensurar esses níveis pelo método qualitativo, uma vez que essa diferença de cor pode estar relacionada com maior ou menor quantidade de lignina presente no tecido (Stange & McDonald 1999).

O indutor ESM não causou efeito qualitativo sobre as cultivares, quanto à resistência da parede celular a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. No entanto, em tomateiro, esse indutor não impediu a penetração de *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici* na raiz, mas induziu uma mudança estrutural, caracterizada pelo aumento na densidade da cor azul da parede celular e oclusões dos espaços intercelulares com material amorfo corado com azul de toluidina, constituindo-se numa barreira estrutural (Benhamou & Bélanger 1998).

O aumento do grau de lignificação da parede celular do xilema em caupi, induzida por quitosana, deve conferir resistência ao patógeno *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, sendo observada ação desse indutor em outros patossistemas, como a resistência de pepino (*Cucumis sativus* L.) a *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp., através de reações do hospedeiro, caracterizadas pela oclusão de células do parênquima com material amorfo, sendo evidenciada a invasão do fungo no sistema vascular (Ghaouth *et al.* 1994). Assim como em tomateiro, a resistência conferida às células da endoderme de *F. oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, através da deposição de glóbulos amorfos do citoplasma na parede celular e acumulação de material eletro-denso, sugerem que, na deposição de fenóis ou compostos lignificados, estes desempenham papel fundamental no estabelecimento de resistência efetiva contra a colonização fúngica (Benhamou *et al.* 1994).

Efeito de indutores na capacidade funcional do xilema de plantas de caupi – A influência dos indutores ESM, BABA e quitosana, em plantas de caupi inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, aos 17 e 25 dias após germinação, é observada na Tab. 1. Ao final de 17 dias de cultivo foi observado um desenvolvimento significativo no diâmetro dos maiores elementos do xilema, promovido pelo indutor ESM nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, com 68,97 µm e 55,84 µm, respectivamente.

A cultivar BR-17 Gurguéia, sob a ação do indutor ESM, apresentou diâmetro médio significativamente maior (68,97 μm) em relação à ação dos demais indutores, sendo encontradas diferenças significativas entre BABA, quitosana e a testemunha. Comportamento semelhante foi encontrado para a cultivar IPA-206, a qual apresentou maiores valores de diâmetro médio dos vasos xilemáticos sob a ação do indutor ESM (55,84 μm) seguido da testemunha (51,93 μm).

A ação do indutor quitosana, aos 25 dias de cultivo, mostrou diferença significativa, quanto aos maiores diâmetros dos vasos xilemáticos, na cultivar BR-17 Gurguéia com 42,01 μm , quando comparada com a testemunha (36,14 μm). Entretanto, para a cultivar IPA-206, a testemunha apresentou maior diâmetro (47,18 μm), diferindo estatisticamente dos indutores BABA e quitosana. Considerando, ainda, esse mesmo período de avaliação, o indutor ESM apresentou o segundo maior diâmetro interno dos vasos (40,28 e 41,25 μm), porém, não diferindo estatisticamente de quitosana e da testemunha, nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, respectivamente.

Na análise da capacidade funcional do xilema, foram observados efeitos mais visíveis aos 17 dias após cultivo em casa de vegetação, quando o indutor ESM mostrou-se como o indutor causador de menor influência significativa no desenvolvimento dos elementos de condução do xilema de ambas cultivares de caupi BR-17 Gurguéia e IPA-206, permitindo a estas células um período maior para a maturação destes elementos. Os demais indutores se mostraram inibidores do desenvolvimento destas células, fazendo com que as mesmas apresentassem um diâmetro hidráulico final inferior em relação às demais, quando submetidas aos indutores BABA e quitosana.

Os maiores valores no diâmetro do lúmen dos elementos de vaso do xilema indicam que estas células apresentaram maior grau de desenvolvimento volumétrico ao final do crescimento. Isto significa que o controle do indutor sobre os valores de diâmetro hidráulico e, conseqüentemente, na condutância hidráulica, reside na extensão e/ou encurtamento do tempo de desenvolvimento volumétrico destas células.

Em relação ao número de elementos condutores do xilema, em plantas avaliadas aos 17 dias, foi observada menor quantidade destes nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, quando induzidas com ESM. Os maiores números foram encontrados no material induzido pelo BABA, 19 vasos, enquanto que as testemunhas das duas cultivares apresentaram um número médio de 13 elementos. Aos 25 dias, os números de elementos apresentados nos tratamentos foram similares, entre as duas cultivares, sendo que a maior quantidade de maiores elementos foram observados em plantas tratadas com quitosana e nas testemunhas, com 18 e 19, respectivamente. O indutor ESM apresentou menor número de vasos,

porém, com maior diâmetro; efeito inverso foi observado pelos outros indutores, que proporcionaram a formação de maior número de vasos, mas com diâmetros reduzidos.

A condutância hidráulica, resultante da mensuração dos maiores elementos de vaso do xilema, avaliada aos 17 dias após a germinação, diferiu significativamente em resposta ao indutor ESM nas duas cultivares testadas, a qual, proporcionou maior pressão no transporte de água, embora, tenha apresentado menor número de vasos com maior diâmetro. Nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, as condutâncias hidráulicas foram de 275,86 μm e 223,37 μm , respectivamente. Os demais indutores apresentaram atividade de condutância inferior aos encontrados nas testemunhas.

Na avaliação aos 25 dias, a cultivar BR-17 Gurguéia mostrou diferença significativa entre a testemunha (144,55 μm) e o indutor quitosana (168,05 μm), sendo que o ESM mostrou o segundo maior fluxo de água nos vasos (161,14 μm). Porém, na cultivar IPA-206, a testemunha apresentou maior condutância hidráulica (188,73 μm), seguida de ESM, apesar de não ter diferido desta estatisticamente. De acordo com Gibson *et al.* (1984), a condutância hidráulica do xilema é importante característica física na determinação da taxa do movimento do fluxo de água em plantas.

Uma vez que a funcionalidade hidráulica do xilema é avaliada através da capacidade condutora de água no interior dos vasos xilemáticos, ela é uma resposta direta dos valores do diâmetro do lúmen dos elementos de vaso. Estes valores podem ser alterados em função da variação no número dos maiores vasos do xilema presentes no feixe vascular radicular. Pimentel-Galindo (2001) encontrou os maiores diâmetros do lúmen do xilema em folhas de *Atriplex nummularia* Lindl., produzidas por indivíduos submetidos às concentrações de 50 e 100 Mmol de NaCl, embora a condutância hidráulica não tenha sofrido alterações, quando comparada às plantas submetidas à concentração de 300 Mmol de NaCl, indicando que a manutenção da condutância ocorreu devido ao aumento do número de elementos do xilema.

O aumento na condutância hidráulica no sistema radicular da cultivar BR-17 Gurguéia ocorreu em decorrência de um maior diâmetro dos elementos de vaso do xilema, observado em plantas tratadas com ESM, onde, mesmo tendo sido constatado que essas plantas apresentaram menor número de elementos, a condutância hidráulica foi maior que na testemunha. Essa relação entre maior diâmetro de elementos de vaso do xilema e maior condutância, também foi encontrada por Chiu & Ewers (1992) em *Lonicera japonica* Thunb., constatando que o maior diâmetro dos vasos proporcionaram maior condutância hidráulica. Arnold & Mauseth (1999) observaram que *Ceres peruviano* (L.) Miller, tratadas com altos níveis de luz, nitrogênio e fósforo, não apresentaram nenhuma mudança significativa nos diâmetros dos vasos, e nenhum tratamento resultou em vasos maiores que os da testemunha.

Porém, o baixo nível de nitrogênio e fósforo induziu uma baixa condutância específica estimada pela indução da formação de vasos menores.

A condutância hidráulica de todos os maiores vasos do xilema do feixe vascular radicular apresentou comportamento estatisticamente igual ao diâmetro hidráulico dos dez maiores vasos de xilema encontrados neste mesmo feixe. Isto significa que, apesar da existência de maior número de elementos com redução no diâmetro, a funcionalidade do feixe permanece inalterada em virtude da preponderância funcional dos dez maiores vasos. Este resultado mostra que para este tipo de avaliação, a mensuração dos dez maiores vasos de xilema do feixe é suficiente para garantir a exatidão do conhecimento da funcionalidade destas células

Tabela 1. Médias de diâmetro hidráulico (DL) dos 10 maiores elementos condutores, número de elementos condutores do xilema (ECX) e condutância hidráulica (Kh) dos maiores vasos do xilema de raízes das cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, 17 e 25 dias após indução ESM, BABA e Quitosana.

PERÍODO	CULTIVAR	INDUTOR	PARÂMETRO		
			DL (μm)	Nº ECX	Kh ($\times 10^6$)
17 dias	BR-17 Gurguéia	ESM	68,97 a	10	275,86 a
		BABA	53,14 b	14	212,50 b
		Quitosana	54,31 b	13	217,26 b
		Testemunha	55,56 b	13	222,24 b
		CV (%)	37,03		
	IPA-206	ESM	55,84 a	10	223,37 a
		BABA	44,08 b	19	176,31 b
		Quitosana	44,08 b	17	176,31 b
		Testemunha	51,93 ab	13	207,74 ab
		CV (%)	21,22		
25 dias	BR-17 Gurguéia	ESM	40,28 ab	13	161,14 ab
		BABA	36,04 b	13	144,15 b
		Quitosana	42,01 a	18	168,05 a
		Testemunha	36,14 b	19	144,55 b
		CV (%)	30,01		
	IPA-206	ESM	41,25 ab	15	165,01 ab
		BABA	38,66 b	16	154,66 b
		Quitosana	40,75 b	18	162,84 b
		Testemunha	47,18 a	19	188,73 a
		CV (%)	33,16		

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Referências bibliográficas

- Albuquerque, M.P. de; Coelho, R.S.S. & Perez, J.O. 2001. Avaliação de linhagens e cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) em relação a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. **Caderno Omega** 12:5-7.
- Arnold, D.H. & Mauseth, J.D. 1999. Effects of environmental factors on development of wood. **American Journal of Botany** 86:367-371.
- Baum, S.F.; Tran, P.N. & Wendy, K.S. 2000. Effects of salinity on xylem structure and water use in growing leaves of sorghum. **New Phytologist** 146:119-127.
- Benhamou, N. & Bélanger, R.R. 1998. Benzoyhiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisi* in tomato. **Plant Physiology** 118:1203-1212.
- Benhamou, N. 1992. Ultrastructural and cytochemical aspects of quitosana on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. **Phytopathology** 82:1185-1193.
- Benhamou, N.; Kloepper, J.W. & Tuzun, S. 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta** 204:153-168.
- Benhamou, N.; Lafontaine, P.J. & Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crow and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology** 84:1432-1444.
- Brammal, R.A. & Higgins, V.J. 1988. A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistance to *Fusarium* crow and root rot disease. **Canadian Journal Botany** 66:915-925.
- Cheeseman, J.M. (1988): Mechanisms of salinity tolerance in plants. **Plant Physiology** 87:547-550.
- Chen, Y.; Shin, J. & Liu, Z. 2002 Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. **Plant Physiology and Biochemistry** 40:33-39.

- Chiu, S.T. & Ewers, F.W. 1992. Xylem structure and water transport in a twiner, a scrambler, and shrub of *Lonicera* (Caprifoliaceae). **Tress** 6:216-224.
- Cole, D.L. 1999 The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. **Crop Protection** 18:267-273.
- Conrath, U.; Pieterse, C.M.J. & Mauch-mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science** 7:210-216.
- Dantas, J.P.; Sales, A.L. de; Santos, P.T.A. dos & Andrade, S.I. de O. 2001. Seleção de cultivares e/ou linhagens de feijão caupi com tolerância ao estresse salino II-área foliar e teor de proteínas. Pp. 124-128. In: **Anais da V Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi**. Teresina, 2001. EMBRAPA MEIO-NORTE Ed. Teresina.
- Dixon, R.A. & Harrison, M.J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review Phytopathology** 32:479-501.
- Freitas, J.B.S.; Chagas, R.M.; Almeida, I.M.R.; Cavalcanti, F.R. & Silveira, J.A.G. 2001. Caracteres fisiológicos relacionados com a tolerância ao estresse salino de feijão caupi. Pp. 115-118. In: **Anais da V Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi**. Teresina, 2001. EMBRAPA MEIO-NORTE Ed. Teresina.
- Ghaouth, A.; AruL, J.; Grenier, J.; Benhamou, N.; Asselin, A. & Bélanger, R. 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology** 94:313-320.
- Gibson, A.C.; Calkin, H.W. & Nobel, P.S. 1984. Xylem anatomy, water flow, and hydraulic conductance in the fern *Cyrtomium falcatum*. **American Journal of Botany** 71:564-574.
- Hacke, U.G. & Sperry, J.S. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics** 4:97-115.

- Halfield, R. & Vermerris, W. 2001. Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. **Plant Physiology** **126**:1351-1357.
- Jakab, G.; Toquin, C.V.; Rigoll, C.; Zemmerli, L.; Métraux, J. & Mauch-maní, B. 2001. β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology** **107**:29-37.
- Jensen, W.A. (1962). Botanical histochemistry-principles and practice. London: W.H. Freeman & Company.
- Johansen, D.A. (1940). Plant microtechnique. New York: McGeaw-Hill Book Co. Inc.
- Joyce, B.J. & Steiner, K.C. 1995. Systematic variation in xylem hydraulic capacity within the crown of whit ash (*Fraxinus americana*). **Tree Physiology** **15**:649-656.
- Keller, H.; Blein, J.; Bonnet, P. & Ricci, P. 1996. Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. **Plant Physiology** **110**:365-376.
- Krauter, D. 1985. Erfahrungen mit Etzolds FSA-Färbung für pflanzenschnitte. **Mikroskosmos** **74**:231-233.
- Linton, M.L. & Nobel, P.S. 1999. Loss of water transport capacity due to xylem cavitation in roots of two CAM succulents. **American Journal of Botany** **86**:1538-1543.
- Lyon, G.D. & Newton, A.C. 1997. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology** **46**:636-641.
- Martre, P.; Durand, J.L. & Cochard, H. 2000. Changes in axial hydraulic conductivity along elongating leaf blades in relation to xylem maturation in tall fescue. **New Phytologist** **146**:235-247.
- Pimentel-Galindo, R.M. 2001. **Variações estruturais e funcionais dos tricomas vesiculares e dos elementos xilemáticos em folhas de *Atriplex nummularia* Lindl., em resposta à salinidade.** Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- Redman, R.S.; Freeman, S.; Clifton, D.R.; Morrel, J.; Brow, G. & Rodriguez, R.J. 1999. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology** 119:795-804.
- Santos, A.C.O. dos. 2001. **Feijão camaratu, *Crotalaria mollis*: aspectos estruturais e ultraestruturais, purificação, caracterização e imunolocalização de isolectinas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Schubert, A.; Lovisolo, C. & Peterlunger, E. 1999. Shoot orientation affects vessel size, shoot hydraulic conductivity and shoot growth rate in *Vitis vinifera* L. **Plant Cell and Environmental** 22:197-204.
- Solomon, M.; Gedalovich, E.; Mayer, A.M. & Mayber, P. 1986. Changes induced by salinity to the anatomy and morphology of excised pea roots in culture. **Annals of Botany** 57:811-818.
- Stange, R.R. & McDonald, R.E. 1999. A simple and rapid method for determination of lignin in plant tissues-its usefulness in elicitor screening and comparison to the thioglycolic acid method. **Postharvest Biology and Technology** 15:185-193.
- StatSoft. 1995. **Etatistic for Windows**. <http://www.statsoft.com/>
- Sticher, L.; Mauch-mani, B. & Métraux, J. 1997. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology** 35:235-270.
- Trillas, M.I.; Cotxarrera, L.; Casanova, E. & Cortadellas, N. 2000. Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 56:107-116.
- Vance, C.P.; Kirk, T.K. & Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology** 18:259-288.

Xuei, X.L.; Järfors, U. & Kúc, J. 1988. Ultrastructural changes associated with induced systemic of cucumber to disease: host response and development of *Colletotrichum lagenarium* in systemically protected leaves. **Canadian Journal of Botany** 66:1228- 1238.

Zimmerman, U.; Haase, A.; Langbein, D. & Meinzer, F. 1993. Mechanisms of long-distance water transport in plants: a re-examination of some paradigms in the light of new evidence. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** 341:19-31.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando os estudos com base na avaliação de germoplasmas de caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, ativação da resistência sistêmica adquirida por indutores abióticos e caracterização de mecanismos bioquímicos, estruturais e funcionalidade do xilema, pode-se concluir que:

- ✓ Das 30 cultivares e linhagens testadas, metade apresentaram reação de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, quando avaliadas por escala de notas, destacando-se as linhagens L-288004 e L-190004;
- ✓ Os métodos de inoculação tipo *deeping* e ferimento em raízes proporcionaram o mesmo tipo de reação na cultivar BR-17 Gurguéia, no entanto, o método *deeping* induziu sintomas mais rápido em plantas de caupi do que o método de ferimento em raízes;
- ✓ Dentre os isolados testados, o ISO-PE apresentou maior agressividade que o ISO-PA, quando inoculado na cultivar BR-17 Gurguéia, avaliado com base em escala de notas e índice de doença;
- ✓ A análise da herança da resistência da geração F_2 , permitiu inferir que houve a segregação de dois genes independentes, um recessivo e outro dominante;
- ✓ A resistência sistêmica em caupi, foi ativada pelo uso dos indutores ESM, BABA e quitosana, após inoculação com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, destacando-se ESM, que proporcionou controle da doença nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206;

- ✓ O indutor ESM apresentou melhores resultados nas atividades de β -1,3-glucanase, peroxidase e PAL, destacando-se a cultivar IPA-206
- ✓ Ocorreu uma relação inversa entre a atividade da PR-proteína β -1,3-glucanase e índice da doença murcha de fusário em caupi;
- ✓ O uso de indutores permitiu a redução da severidade da murcha de fusário em caupi, principalmente, o indutor ESM, que desencadeou a produção da PR-proteína β -1,3-glucanase, como mecanismo bioquímico da resistência sistêmica adquirida, podendo ser usado como estratégia no manejo da cultura do caupi;
- ✓ Dos indutores usados, quitosana proporcionou maior lignificação de paredes do xilema de raízes de plantas de caupi e o indutor ESM mostrou-se causador de menor influência no desenvolvimento dos elementos de condução do xilema das cultivares avaliadas;
- ✓ O indutor ESM proporcionou, aos 17 dias, maior condutância hidráulica na cultivar BR-17 Gurguéia, proporcionada pelo desenvolvimento de vasos de maior diâmetro, contudo, aos 25 dias, o indutor quitosana, proporcionou esse mesmo efeito na cultivar BR-17 Gurguéia;
- ✓ A avaliação da funcionalidade dos elementos de vaso do xilema, através da condutância hidráulica em plantas de caupi sob efeito dos indutores ESM, BABA e quitosana pode ser determinada com exatidão pela mensuração dos dez maiores vasos.