

LEANDRO DE CASTRO SILVA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E RESPOSTAS OXIDATIVAS EM
FEIJOEIRO INFECTADO POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var.
*fuscans***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586a
2016
Silva, Leandro de Castro, 1989-
Alterações fisiológicas e respostas oxidativas em feijoeiro
infectado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*
/ Leandro de Castro Silva. – Viçosa, MG, 2016.
vii, 40f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Rogério de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Feijão - Doenças e pragas. 2. *Xanthomonas axonopodis*
pv. *phaseoli* var. *fuscans*. 3. Fotossíntese. 4. Fluorescência.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.
II. Título.

CDD 22 ed. 635.6529

LEANDRO DE CASTRO SILVA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E RESPOSTAS OXIDATIVAS EM
FEIJOEIRO INFECTADO POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var.
*fuscans***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 28 de julho de 2016.

Hélvio Gledson Maciel Ferraz

José Ivo Ribeiro Júnior

Fabício de Ávila Rodrigues
(Coorientador)

José Rogério de Oliveira
(Orientador)

À minha família,
meu pai José Antônio,
minha mãe Maria dos Anjos,
e minha namorada Verônica.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a Deus por mais esta oportunidade.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Fitopatologia e ao Programa de Pós-graduação em Fitopatologia por proporcionarem condições de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao professor José Rogério de Oliveira pela orientação e confiança.

Ao professor Fabrício Ávila Rodrigues pela orientação, amizade e confiança.

Ao professor José Eustáquio de Souza Carneiro por nos ceder as sementes de feijoeiro para a execução dos experimentos.

Ao professor José Ivo Ribeiro Júnior pela orientação nas análises estatísticas.

Aos colegas Daniel Debona e Carlos Eduardo Aucique-Pérez pela amizade, companheirismo e ajuda na execução dos experimentos.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo e amizade.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório da Interação Planta-Patógeno e do Laboratório de Bacteriologia pela amizade, apoio e ajuda na execução dos experimentos.

Aos meus pais José Antônio e Maria dos Anjos e a minha namorada Verônica pelo apoio incondicional, dedicação e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Bruno, Camilo e Sueli.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

LEANDRO DE CASTRO SILVA, filho de José Antônio da Silva e Maria dos Anjos de Castro Silva, nasceu em 20 de outubro de 1989 em Viçosa - MG.

Em março de 2009, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em agosto de 2014.

Em agosto de 2014, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa sob orientação do Prof. José Rogério de Oliveira, submetendo-se à defesa da dissertação em 28 de julho de 2016.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
Crescimento das plantas de feijoeiro.....	3
Obtenção do inóculo de Xapf e inoculação das plantas	3
Avaliação da severidade do CBC e determinação da área da lesão	4
Avaliação das trocas gasosas	4
Determinação da concentração de pigmentos	4
Avaliação das imagens e dos parâmetros da fluorescência da clorofila a	4
Determinações bioquímicas	6
Delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	8
RESULTADOS	9
Severidade do CBC e área da lesão.....	9
Trocas gasosas.....	9
Concentração de pigmentos	9
Imagens e parâmetros da fluorescência da clorofila a	10
Atividades das enzimas	11
Concentrações de MDA e H ₂ O ₂	12
Correlações.....	12
DISCUSSÃO	13
REFERÊNCIAS	19
TABELAS E FIGURAS	28

RESUMO

SILVA, Leandro de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Alterações fisiológicas e respostas oxidativas em feijoeiro infectado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans***. Orientador: José Rogério de Oliveira. Coorientador: Fabrício Ávila Rodrigues.

O crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), é a bacteriose mais importante da cultura do feijoeiro. Nesse trabalho objetivou-se determinar as alterações fisiológicas e bioquímicas em cultivares de feijoeiro suscetível (Ouro Negro (ON)) e resistente (Diamante Negro (DN)) à Xapf. Para isso, os parâmetros de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila a, as atividades das enzimas envolvidas no sistema antioxidativo (superóxido dismutase (SOD), peroxidases (POX) e ascorbato peroxidase (APX)) e as concentrações de pigmentos fotossintéticos, de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e aldeído malônico (MDA) foram avaliados. Para as plantas da cultivar ON infiltradas com suspensão de Xapf, os valores de todos os parâmetros de trocas gasosas foram reduzidos em relação às plantas da cultivar DN. Além disso, as concentrações de pigmentos fotossintéticos também foram menores para as plantas infiltradas com suspensão de Xapf na cultivar ON em comparação às da cultivar DN. As atividades da SOD, POX e APX foram maiores para as plantas infiltradas com suspensão de Xapf em relação às infiltradas com solução salina nas duas cultivares, mas com maiores atividades para as plantas da cultivar DN. As concentrações de H_2O_2 e de MDA foram maiores para as plantas infiltradas com suspensão de Xapf em relação às plantas infiltradas com solução salina principalmente na cultivar ON. As primeiras alterações nas imagens da fluorescência da clorofila a, obtidas das folhas cotilédones infiltradas com suspensão de Xapf, ocorreram a partir das 6 horas após a infiltração com suspensão de Xapf e tornaram-se mais expressivas com o desenvolvimento do CBC, principalmente, na cultivar ON. A área abaixo da curva (AAC) dos parâmetros da fluorescência da clorofila a foi menor para as plantas infiltradas com suspensão de Xapf em relação às infiltradas com solução salina para as duas cultivares, porém com menor decréscimo para a cultivar DN. A AAC foi menor para as áreas necróticas (A1) e área intermediária entre a área assintomática e a área necrótica (A2) das folhas cotilédones das plantas infiltradas com suspensão de Xapf em relação às infiltradas com solução salina.

ABSTRACT

SILVA, Leandro de Castro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Physiological changes and oxidative responses in common bean infected by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.** Adviser: José Rogério de Oliveira. Co-adviser: Fabrício Ávila Rodrigues.

The common bacterial blight (CBB), caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf) is the most important bacterial blight of bean crop. In this study aimed to determine the physiological and biochemical changes in susceptible bean cultivars (Ouro Negro (ON)) and resistant (Diamante Negro (DN)) to Xapf. For this, the gas exchange parameters and chlorophyll a fluorescence, activities of the enzymes involved in the antioxidant system (superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX)) and the concentrations of photosynthetic pigments peroxide of (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) were evaluated. For cultivar ON infiltrated with suspension of Xapf, the values of all gas exchange parameters were reduced in relation to cultivar DN. Furthermore, photosynthetic pigments were also lower for plants infiltrated with suspension of Xapf in the ON cultivar compared to cultivar DN. The activities of SOD, POX and APX were higher for plants infiltrated with suspension of Xapf regarding infiltrated with saline two cultivars, but with major activities for the cultivar DN. The H_2O_2 and MDA concentrations were higher for plants infiltrated of Xapf suspension in relation to plants infiltrated with saline solution mostly in farming ON. The earliest changes in chlorophyll a fluorescence images obtained from infiltrated cotyledons with suspension of Xapf occurred from 6 hours after the infiltration suspension of Xapf and became more significant with the development of CBB, especially in farming ON. The area under the curve (AUC) of chlorophyll a fluorescence parameters to was lower for plants infiltrated with suspension of Xapf regarding infiltrated with saline solution for both cultivars, but less decrease to cultivate DN. The AUC was lower for the necrotic areas (A1) and the intermediate area between the area and asymptomatic necrotic area (A2) of the cotyledonary leaves of the plants infiltrated with suspension of Xapf regarding infiltrated with saline.

INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf), é a principal doença bacteriana da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.) podendo causar, em determinadas ocasiões, perdas de até 45% na produção, principalmente, no cultivo das águas (Diaz et al., 2001; Dursun et al., 2002; Mahuku et al., 2006; Torres et al., 2009). No Brasil, o CBC ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de feijão, principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (Torres et al., 2009). Os primeiros sintomas do CBC aparecem como manchas verdes-escuras encharcadas e de aspecto oleoso, com o desenvolvimento da doença, as lesões expandem e adquirem uma coloração marrom com bordos cloróticos conferindo, assim, ao tecido colonizado pela bactéria, um aspecto necrótico denominado de crestamento (Diaz et al., 2001; Mutlu et al., 2008). O CBC tem sido controlado utilizando-se sementes livres da bactéria e cultivares resistentes (Gilbertson et al., 1988; Maringoni et al., 1993; Rava et al., 1990; Rodrigues et al., 1999; Mutlu et al., 2005; Darrasse et al., 2007).

Entre os processos fisiológicos das plantas, a fotossíntese é a mais afetada durante o processo infeccioso dos patógenos foliares (Bastiaans, 1991; Bassanezi et al., 2002; Dallagnol et al., 2011; Resende et al., 2012; Debona et al., 2014). Dessa forma, uma avaliação minuciosa das respostas fotossintéticas nas interações patógeno-hospedeiro pode proporcionar novas estratégias de controle das doenças (Rolfé & Scholes, 2010). A fluorescência da clorofila a é uma técnica útil para monitorar a atividade fotoquímica da fotossíntese e quando associada com a técnica de imagem, as possíveis alterações nos parâmetros associados com a fotossíntese nos tecidos infectados podem ser mapeadas antes mesmo do aparecimento dos sintomas (Baker et al., 2001; Iqbal et al., 2012). Em combinação à determinação das trocas gasosas, a fluorescência da clorofila a permite que uma análise espaço-temporal detalhada da resposta da folha infectada à infecção por um determinado patógeno seja minuciosamente explorada (Baker et al., 2001; Iqbal et al., 2012).

Em resposta a estresses de natureza abiótica e/ou, biótica, a exemplo da infecção por patógenos, as células vegetais podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical livre hidroxila (OH^-), os quais são altamente citotóxicos (Medhy, 1994; Gill & Tuteja, 2010). Um excesso na produção das EROs ocasiona danos celulares como a peroxidação de lipídios e a alteração na estrutura de macromoléculas

essenciais, como os ácidos nucléicos, os pigmentos e as proteínas (Apel & Hirt, 2004). Considerando a natureza citotóxica das EROs, sistemas enzimáticos e não enzimáticos das plantas passam a desempenhar papel fundamental na proteção celular (Scandalios, 1993). Exemplos dessas enzimas são a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do O_2^- a H_2O_2 e constitui a primeira linha de defesa contra as EROs (Alscher et al., 2002); as catalases (CAT) que convertem o H_2O_2 em água e oxigênio (Asada, 1999) e as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, a exemplo das peroxidases do ascorbato (APX), que reduz o H_2O_2 nos plastídios utilizando o ascorbato como doador de elétrons (Yan et al., 1996).

Considerando a importância dos processos fisiológicos e do estresse oxidativo na resistência de plantas a doenças, o presente trabalho teve como objetivos: (i) determinar as possíveis alterações nos parâmetros de trocas gasosas e da fluorescência da clorofila a em cultivares de feijoeiro resistente e suscetível à Xapf e (ii) verificar a resposta do sistema antioxidativo dessas duas cultivares em resposta à infecção por Xapf.

MATERIAL E MÉTODOS

Crescimento das plantas de feijoeiro

Sementes de feijoeiro das cultivares Ouro Negro (ON) e Diamante Negro (DN), consideradas suscetível e resistente, respectivamente, a Xapf (Kobayashi et al., 1999; Embrapa, 1997), foram semeadas em vasos plásticos contendo 1 kg de substrato Tropstrato® (Vida Verde, Mogi Mirim, São Paulo), composto de uma mistura de casca de pinus, turfa e vermiculita expandida (1:1:1). Em cada vaso, foram semeadas quatro sementes e o desbaste foi realizado cinco dias após a emergência deixando-se, apenas, duas plântulas por vaso. As plantas foram adubadas duas vezes por semana com 100 mL de solução nutritiva de Clark (1975) com algumas modificações como segue: 1,04 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 mM NH_4NO_3 , 0,8 mM KNO_3 , 0,069 mM KH_2PO_4 , 0,931 mM KCl , 0,60 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 19 μM H_3BO_3 , 2 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 7 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,6 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 90 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 90 μM ácido etilenodiamino tetra-acético de sódio (EDTA). As plantas foram crescidas em casa de vegetação com temperatura de 30 ± 2 °C e umidade relativa de $70 \pm 5\%$.

Obtenção do inóculo de Xapf e inoculação das plantas

O isolado UnB 772 de Xapf utilizado no presente estudo foi adquirido do Instituto Biológico de São Paulo, preservado em tubos criogênicos contendo glicerol (30%) esterilizado e mantidos em ultrafreezer a -80 °C (Romeiro, 2001). Para obtenção do inóculo de Xapf, a bactéria foi repicada para placas de Petri (9 mm de diâmetro) contendo meio Kado 523 (Kado e Heskett, 1970), incubadas em câmaras de crescimento tipo B.O.D. (temperatura de 28 °C) por 48 horas. Após esse período, as colônias bacterianas foram ressuspensas em solução salina de NaCl estéril (0,85%) para obtenção de uma suspensão bacteriana, ajustada em espectrofotômetro (600 nm) para a densidade ótica de 0,2 (1×10^8 UFC mL^{-1}). Plantas no estágio de crescimento V2 (Fernandes et al., 1986) (15 dias após emergência) foram mantidas em câmara de nevoeiro por 24 horas e, em seguida, as duas folhas cotiledonares de cada planta foram inoculadas com a suspensão bacteriana, utilizando-se seringa hipodérmica de 1 mL (sem agulha) nos dois lados da nervura central. Como controle usou-se plantas cujas folhas cotiledonares foram infiltradas com solução salina e as plantas nas quais não houve infiltração. Após inoculação, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro (temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $90 \pm 5\%$) por 24 horas. Após esse período, as plantas foram transferidas para casa de vegetação, onde permaneceram até

a finalização do experimento. Um sistema de nebulização em que bicos (model NEB-100; KGF Company) pulverizaram uma névoa de água a cada 30 min sobre o dossel das plantas, foi utilizado para manter a umidade relativa acima de 85%.

Avaliação da severidade do CBC e determinação da área da lesão

Seis folhas cotiledonares por unidade experimental foram coletadas aos 14 dias após inoculação (dai) para avaliação da severidade do CBC e determinação do diâmetro das lesões. As folhas cotiledonares foram digitalizadas e as imagens obtidas (resolução de 600 dpi) foram analisadas no software QUANT (Vale et al., 2003) para obtenção dos valores da severidade. As lesões em cada folha cotiledonar foram medidas em dois sentidos perpendiculares com auxílio de um paquímetro digital. Obteve-se a média dos valores e a área da lesão foi calculada utilizando-se a equação $\pi \times r^2$, em que r representa o raio da lesão.

Avaliação das trocas gasosas

As avaliações dos parâmetros de trocas gasosas (taxa líquida de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s) e taxa de transpiração (E)) foram realizadas no período da manhã das 9 às 12 horas utilizando-se um analisador de gás por infravermelho portátil (IRGA, Li-Cor, modelo LI-6400 Nebraska, EUA). Durante as avaliações, a concentração de CO₂ foi mantida em 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de ar e a radiação fotossinteticamente ativa em 1000 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As avaliações foram realizadas aos 1, 3, 6, 10 e 14 dai em quatro folhas cotiledonares.

Determinação da concentração de pigmentos

Aos 14 dai, 4 discos foliares (1 cm²) foram coletados de 4 folhas cotiledonares das plantas por unidade experimental. Os discos foliares foram colocados em tubos de vidro contendo 5 mL de dimetilsulfóxido (saturado com 5 g L⁻¹ de CaCO₃) e cobertos com papel alumínio onde permaneceram por 24 horas a 25 °C. Posteriormente, mediram-se as absorbâncias das amostras a 480, 649 e 665 nm em espectrofotômetro. As concentrações de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b) e de carotenoides (Car) foram estimadas de acordo com Lichtenthaler (1987).

Avaliação das imagens e dos parâmetros da fluorescência da clorofila a

Os parâmetros e as imagens da fluorescência da clorofila a foram obtidos utilizando-se o fluorômetro de imagem Imaging-PAM (modelo IMAG - MAX/L) e o software Imaging Win (Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha). Plantas não infiltradas, infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de Xapf foram aclimatadas no escuro

por 30 min e 4 folhas cotiledonares por unidade experimental foram colocadas individualmente na câmara “charge-coupled device” (CCD) para obtenção das imagens. Primeiramente, foi calculada a fluorescência inicial (F_0) através de um pulso de luz de baixa intensidade ($0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 100 μs , 1 Hz) e, posteriormente, foi emitido um pulso de luz saturante ($2,400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10 Hz) por 0,8 s para o cálculo da fluorescência máxima (F_m), usada para o cálculo do rendimento quântico máximo do fotossistema II ($F_v/F_m = ((F_m - F_0)/F_m)$). As folhas cotiledonares foram expostas à luz actínica durante 4 min para obtenção da fluorescência em estado estacionário (F_s) e, subsequentemente, um pulso de luz saturante foi aplicado para obtenção da fluorescência máxima em estado de luz adaptado (F_m'). A fluorescência inicial (estado de luz adaptado) (F_0') foi estimada de acordo com Oxborough & Baker (1997). Os demais parâmetros foram calculados da seguinte forma: rendimento quântico eficaz do PSII ($Y(\text{II}) = (F_m' - F)/F_m'$), rendimento quântico de dissipação de energia regulada ($Y(\text{NPQ}) = 1 - Y(\text{II}) - 1/(\text{NPQ} + 1 + q_L(F_m/F_0 - 1))$), rendimento quântico de dissipação de energia não regulada ($Y(\text{NO}) = 1/(\text{NPQ} + 1 + q_L(F_m/F_0 - 1))$), quenching não-fotoquímico ($\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$), coeficiente de quenching não-fotoquímico ($q_N = (F_m - F_m')/(F_m - F_0)$), coeficiente de quenching fotoquímico ($q_P = (F_m' - F)/(F_m' - F_0)$), coeficiente de quenching fotoquímico ($q_L = (F_m' - F)/(F_m' - F_0) \times F_0'/F = q_P \times F_0'/F$) e a taxa de transporte de elétrons ($\text{ETR} = 0,5 \times \text{Yield} \times \text{PAR} \times 0,84 \mu$ equivalentes $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Todos os parâmetros foram calculados com o auxílio do Software Imaging Win em folhas cotiledonares coletadas às 6, 12 e 24 horas após inoculação (hai) e aos 3, 6, 10 e 14 dai. Os parâmetros foram determinados em áreas circulares ($\approx 0,78 \text{ cm}^2$) obtidas nas três regiões da folha cotiledonar infiltradas com suspensão de Xapf a saber: área necrótica (A1), área intermediária entre a área assintomática e a área necrótica (A2) e área assintomática (A3) (Fig. 1). Nas folhas cotiledonares das plantas infiltradas com solução salina, as áreas foram assim definidas: área infiltrada (A1), área intermediária entre a região infiltrada e não infiltrada (A2) e área distante do local de infiltração (A3) (Fig. 1). Nas folhas cotiledonares das plantas do tratamento sem infiltração, as três áreas foram escolhidas ao acaso (Fig. 1). Decréscimo ou aumento nos valores dos parâmetros obtidos em cada uma das áreas determinadas nos dois lados das folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf ou infiltradas com solução salina foram calculados com base nos valores obtidos nas folhas cotiledonares das plantas do tratamento sem infiltração.

Determinações bioquímicas

Amostras das folhas cotiledonares das plantas por unidade experimental (4 folhas cotiledonares por tratamento) foram coletadas aos 1, 3, 6 e 9 dai.. As amostras foliares foram colocadas individualmente em envelopes de papel alumínio e rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C para posterior análise.

Determinação das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidases (POX, EC 1.11.1.7) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

Para obter o extrato foliar a ser utilizado nas determinações das atividades da SOD, POX e APX, um total de 0,3 g de fragmentos de tecido foliar foram macerados com pistilo em almofariz contendo N₂ líquido até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8) contendo EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônio (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 2% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 × g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado como extrato para as determinações enzimáticas.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 10 µL do extrato foliar em 240 µL de mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de p-nitro-tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM (Del Longo et al., 1993). A reação ocorreu a 25°C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro a 560 nm (Giannopolitis & Ries, 1977). As amostras do tratamento infiltração com solução salina tiveram suas absorbâncias medidas a 560 nm utilizando-se mistura de reação mantida no escuro por 10 min. Os valores obtidos foram subtraídos das leituras das amostras das unidades experimentais que receberam iluminação. Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50% (Beauchamp & Fridovich, 1971). A atividade da POX foi determinada pela oxidação do pirogalol de acordo com a metodologia proposta por Kar & Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM em um volume de 250 µL. A reação foi iniciada pela adição de 10 µL do extrato foliar e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nm durante 1 min a 25 °C. O

coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance & Maehley, 1955) foi utilizado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em μM de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano & Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H_2O_2 1 mM e ascorbato 0,8 mM em um volume de 241 μL . A reação foi iniciada pela adição de 9 μL do extrato foliar e a atividade foi medida pela oxidação do ascorbato a 290 nm durante 1 min a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano & Asada, 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Determinação das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de aldeído malônico (MDA)

Para determinação das concentrações de H_2O_2 e MDA, amostras de 0,2 g de tecido foliar foram maceradas com pistilo em almofariz contendo N_2 líquido até a obtenção de um pó fino. Para determinar a concentração de H_2O_2 , o pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e hidroxilamina 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ durante 15 min a 4 °C (Kuo & Kao, 2003). Foram adicionados 10 μL do sobrenadante ao meio de reação constituído de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)$ 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM em um volume de 200 μL (Gay & Gerbicki, 2000). As amostras foram mantidas no escuro por 30 min e a absorbância determinada a 560 nm. A concentração de H_2O_2 , estimada com base em uma curva padrão de H_2O_2 , foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca. Para determinação da concentração de MDA, o pó obtido foi homogeneizado em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$ durante 15 min a 4 °C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA), incubado em banho-maria a 95 °C por 30 min e a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 10 min e a absorbância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca (Heath & Packer, 1968).

Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Dois experimentos (Experimentos 1 e 2) foram instalados no esquema fatorial 2×3 com seis repetições por tratamento, sob o delineamento inteiramente casualizado. Neles, foram estudadas as combinações de cultivares de feijoeiro (Ouro Negro e Diamante Negro) com folhas cotiledonares infiltradas (infiltradas com suspensão de Xapf, infiltradas com solução salina, sem infiltração). Nesses experimentos, obtiveram-se os valores da severidade do CBC, das áreas das lesões, dos parâmetros de trocas gasosas, dos parâmetros da fluorescência da clorofila a e da concentração de pigmentos. Para os parâmetros da fluorescência da clorofila a, além dos fatores citados, considerou-se também as três áreas nas folhas cotiledonares das plantas infiltradas. Os dados obtidos em cada um dos experimentos foram submetidos à análise de variância e combinados com base na homogeneidade das variâncias pelo teste de F máximo de Hartley (1950). O terceiro experimento (Experimento 3) foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 com quatro repetições para obtenção das amostras para as avaliações bioquímicas. Os fatores estudados foram cultivares de feijoeiro (Ouro Negro e Diamante Negro) e plantas infiltradas (infiltradas com solução de Xapf e infiltradas com solução salina). Os valores dos parâmetros de trocas gasosas, das atividades das enzimas e das concentrações de MDA e de H_2O_2 foram utilizados para calcular a área abaixo da curva (AAC) para cada um dos parâmetros e variáveis avaliados. Para os parâmetros da fluorescência da clorofila a, os valores dos mesmos foram somados para se obter a AAC para cada um dos tratamentos apenas aos 14 dai. Em cada um dos experimentos, a unidade experimental foi constituída de um vaso plástico contendo duas plantas de feijoeiro (quatro folhas cotiledonares). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o software SAS (versão 9.0., SAS Institute Inc., Cary., NC., USA).

RESULTADOS

Considerando que não houve diferença entre os tratamentos folhas infiltradas com solução salina e folhas não infiltradas nos Experimentos 1 e 2 utilizou-se apenas o tratamento folhas infiltradas com solução salina para a apresentação dos resultados.

Severidade do CBC e área da lesão

Houve efeito do fator cultivar sobre a severidade do CBC e área de lesão (Tabela 1). Nas folhas das plantas da cultivar ON, as lesões necróticas foram maiores e apresentaram um halo clorótico bem acentuado, enquanto que para a cultivar DN, as lesões necróticas foram menores e com halo clorótico quase imperceptível (Fig. 2A e B). Houve reduções de 59 e 47%, respectivamente, para a severidade do CBC e a área de lesão na cultivar DN em comparação com a cultivar ON (Fig. 2C).

Trocas gasosas

Houve efeito dos fatores cultivares e infiltrações e da interação entre eles para os parâmetros A , g_s e E (Tabela 1). Para a cultivar ON, houve reduções de 64, 71 e 60% nos valores da AAC de A , g_s e E , respectivamente, para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em comparação com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Para a cultivar DN, reduções de 46, 56 e 41% nos valores das AAC de A , g_s e E , respectivamente, ocorreram para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em contraste com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Não houve diferença entre as cultivares considerando as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Porém, para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf, houve reduções de 35, 37, 32% nos valores das AAC de A , g_s e E , respectivamente, para a cultivar ON em comparação com a cultivar DN (Fig. 3A-F).

Concentração de pigmentos

Houve efeito dos fatores cultivares e infiltrações e da interação entre eles para a concentração de pigmentos (Tabela 1). Para a cultivar ON, houve reduções de 80 e 82% nos valores das concentrações de Chl a+b e de Car, respectivamente, para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em comparação com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Para a cultivar DN, reduções de 66 e 68% nos valores das concentrações de Chl a+b e de Car, respectivamente, ocorreram para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em contraste com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Não houve diferença entre as cultivares

considerando as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Porém, para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf, houve reduções de 59 e 57% nos valores das concentrações de Chl a+b e de Car, respectivamente, para a cultivar ON em comparação com a cultivar DN (Fig. 4A-B).

Imagens e parâmetros da fluorescência da clorofila a

As primeiras alterações nas imagens da fluorescência da clorofila a obtidas das folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf ocorreram a partir das 6 hai e tornaram-se mais expressivas à medida que as lesões do CBC se expandiram, principalmente nas folhas cotiledonares das plantas da cultivar ON em comparação com a cultivar DN (Figs. 5-6). Os parâmetros F_v/F_m , Y(II), Y(NO) e Y(NPQ) foram mais afetados nas folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf do que nas folhas cotiledonares infiltradas com solução salina, principalmente das plantas da cultivar ON (Figs. 5-6). Alterações no parâmetro Y(II) em comparação com os demais foram mais evidentes às 6 hai. Perda progressiva na atividade fotossintética foi observada na região central das lesões conforme indicada pela coloração escura nas imagens (Figs. 5-6). Em cada lesão, a necrose do tecido foliar, em associação com a perda da propriedade óptica desse tecido, indicou a quase completa destruição do aparato fotossintético.

Para as folhas infiltradas com solução salina, alterações aparentes nos parâmetros avaliados foram quase que imperceptíveis independente da cultivar e da área foliar avaliada. Os valores do parâmetro Y(NO) aumentaram com o desenvolvimento do CBC (Figs. 7-8), enquanto que os valores para os parâmetros Y(II), Y(NPQ), NPQ e q_p foram reduzidos. Na área A1, as diferenças nos padrões de variação dos parâmetros avaliados foram mais expressivas das 6 às 12 hai, independente da cultivar (Figs. 7-8). Para a cultivar ON, ao contrário da cultivar DN, os valores dos parâmetros apresentaram uma rápida variação das 6 hai aos 10 dai, sendo que aos 14 dai tais variações foram semelhantes nas duas cultivares. Na área A2, não houve diferença aparente nos padrões de variação dos parâmetros avaliados das 6 hai aos 3 dai, porém, a partir dos 6 e 10 dai, tais variações tornaram-se mais perceptíveis, respectivamente, para as folhas cotiledonares das plantas das duas cultivares. Na área A3, diferenças nos padrões dos parâmetros avaliados tornaram-se notáveis a partir dos 10 dai para a cultivar ON enquanto que para a cultivar DN tais diferenças não foram aparentes (Figs. 7-8).

Houve efeito dos fatores infiltração e áreas de avaliação, bem como para as interações cultivares \times infiltração e infiltração \times áreas de avaliação (Tabela 2). Houve redução de 38 e 31%, respectivamente, para as cultivares ON e DN, para a AAC de todos os parâmetros obtidos das folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em comparação com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Não houve diferença para a AAC entre as cultivares considerando as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Porém, para as folhas cotiledonares, houve redução de 7% no valor da AAC para a cultivar ON em comparação com a cultivar DN (Figs. 6-7). Não houve diferença significativa entre as áreas A1, A2 e A3 independente da cultivar. Houve reduções de 77 e 24% na AAC, respectivamente, para as áreas A1 e A2 entre as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de Xapf. Para a área A3, não houve diferença entre as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de Xapf (Figs. 7-8).

Atividades das enzimas

Houve efeito apenas do fator infiltração e da interação cultivares \times infiltração para a atividade de todas as enzimas avaliadas (Tabela 1). Para as AAC das atividades da SOD e APX, não houve diferença entre as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de Xapf das plantas da cultivar ON (Fig. 8A e E). Porém, para a cultivar DN, houve aumento de 38% na AAC da atividade da SOD para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em relação as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Para as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina, houve aumento de 19% na AAC da atividade da SOD para a cultivar ON em comparação com a cultivar DN. Não houve diferença significativa entre as cultivares considerando as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf (Fig. 9A e B). Houve aumento de 14% para a AAC da atividade da POX para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em relação às folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Para a cultivar DN, aumentos de 55 e 43% para a AAC das atividades da POX e APX, respectivamente, foram obtidos para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em comparação com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Não houve diferença entre as cultivares considerando as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Porém, para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf, houve aumentos de 17

e 13% para a AAC das atividades da POX e APX, respectivamente, para a cultivar DN em comparação com a cultivar ON (Fig. 9C-F).

Concentrações de MDA e H₂O₂

Para a concentração de MDA, houve efeito apenas do fator infiltração e da interação cultivares × infiltração. Para a concentração de H₂O₂, houve efeito significativo apenas dos fatores cultivares e fator infiltração das folhas cotiledonares (Tabela 1). Para a cultivar ON, houve aumentos de 25 e 84% na AAC das concentrações de MDA e H₂O₂, respectivamente, para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em comparação com as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Para a cultivar DN, não houve diferença significativa para a AAC da concentração de MDA entre as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de Xapf. A AAC da concentração de H₂O₂ aumentou significativamente em 52% para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf em relação às folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Não houve diferença significativa entre as cultivares para a AAC das concentrações de MDA e H₂O₂ considerando as folhas cotiledonares infiltradas com solução salina. Para as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf, houve aumento significativo de 11% na AAC da concentração de MDA para a cultivar ON em comparação com a cultivar DN. Para a AAC da concentração de H₂O₂, não houve diferença significativa entre as cultivares considerando as folhas cotiledonares infiltradas com suspensão de Xapf (Fig. 10A-D).

Correlações

A correlação tanto da severidade do CBC quanto da área de lesão com os parâmetros Y(II), q_P, q_L e ETR foi negativa para as áreas A2 e A3. Para a área A3, houve correlação positiva tanto da severidade do CBC quanto da área de lesão e os parâmetros Y(NPQ) e q_N (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta, pela primeira vez na literatura, informações sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas decorrentes do processo infeccioso de *Xapf* em folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro. O efeito deletério da infecção por *Xapf* no desempenho fotossintético do feijoeiro foi comprovado pelas reduções em A , g_s e E nas folhas infiltradas com suspensão de *Xapf*, consistente com resultados obtidos para os patossistemas arroz-*Pyricularia oryzae* (Bastiaans, 1991), milho-*Phaeosphaeria maydis* (Godoy et al., 2001), feijoeiro-*Uromyces appendiculatus*, feijoeiro-*Pseudocercospora griseola* e feijoeiro-*Colletotrichum lindemuthianum* (Bassanezi et al., 2002), trigo-*Puccinia triticina* (Robert et al., 2005), videira-*Uncinula necator* e videira-*Plasmopara viticola* (Moriondo et al., 2005), em que a infecção pelos patógenos reduziu os valores de A .

Os maiores decréscimos em A estiveram relacionados com a maior severidade do CBC e da área da lesão nas folhas cotiledonares das plantas da cultivar ON em relação à cultivar DN. De acordo com Alves et al. (2011), somente plantas de eucalipto suscetíveis a *Puccinia psidii* apresentaram reduções nos valores de A . Essa mesma tendência foi verificada em outros patossistemas tais como arroz-*P. oryzae* (Bastiaans & Roumen, 1993) e castanheira-*Phytophthora cinnamomi* (Dinis et al., 2011).

As reduções concomitantes nos valores de g_s e E nas folhas cotiledonares das plantas das duas cultivares de feijoeiro durante o processo infeccioso de *Xapf* pode estar associada com o fechamento dos estômatos. Para os patossistemas trigo-*P. triticina* (McGrath & Pennypacker, 1990) feijoeiro-*U. appendiculatus*, *P. griseola* e *C. lindemuthianum* (Duniway & Durbin, 1971; Bassanezi et al., 2002), eucalipto-*P. psidii* (Alves et al., 2011) e arroz-*B. oryzae* (Dallangol et al., 2011) houve reduções significativas nos valores de g_s e E nos estádios avançados da infecção por esses patógenos. De acordo com Erickson et al. (2003), a redução em g_s é um dos principais fatores limitantes à fotossíntese em plantas infectadas por patógenos, uma vez que o influxo de CO_2 decresce dramaticamente. De acordo com o presente estudo, o parâmetro g_s foi o que sofreu menor alteração nas folhas cotiledonares das plantas da cultivar DN infiltradas com suspensão de *Xapf* por terem apresentado os menores valores de severidade do CBC, em contraste com as plantas da cultivar ON. De maneira similar, plantas de cultivar de eucalipto suscetível à ferrugem inoculadas com *P. psidii* apresentaram reduções nos valores de g_s , enquanto que nas plantas de cultivar

resistente não foram observadas alterações nos valores de g_s em comparação com as plantas não inoculadas (Alves et al., 2011).

A destruição das moléculas de clorofila ou dos cloroplastos resultando, assim, em clorose seguida de necrose do tecido foliar, pode afetar negativamente a fotossíntese nas folhas infectadas por patógenos com diferentes estilos de vida (Bassanezi et al., 2002; Dallagnol et al., 2011; Debona et al., 2014). No presente estudo, menores concentrações de pigmentos fotossintéticos foram observadas nas folhas cotiledonares das plantas infiltradas com suspensão de Xapf, principalmente da cultivar ON, nas quais obtiveram-se também os menores valores de A. Redução na concentração de Chla+b acarreta redução na capacidade e na eficiência das folhas em capturar a energia necessária para as reações fotoquímicas que ocorrem na fotossíntese (Chauhan et al., 1997). De acordo com Kumudini et al. (2008), em folhas de soja infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*, a perda na capacidade fotossintética foi associada, em primeira instância, com um decréscimo na concentração de clorofilas e na redução da absorção de luz pelas folhas. No presente estudo, a infecção por Xapf pode ter comprometido a integridade estrutural da rede de tilacóides reduzindo, assim, a capacidade de transporte de elétrons e a fixação de CO₂ no tecido foliar.

Antes do aparecimento dos sintomas do CBC, observaram-se mudanças nos padrões dos parâmetros de fluorescência da clorofila a nas folhas cotiledonares das plantas infiltradas com suspensão de Xapf das duas cultivares, principalmente reduções nos valores de Y(II) e q_p e aumento nos valores de Y(NPQ). Reduções nos valores de Y(II) refletem decréscimo na taxa de transporte de elétrons aparente; reduções nos valores de q_p são justificadas por uma menor fração de luz absorvida que é dissipada fotoquimicamente; e aumento nos valores de Y(NPQ) indicam maior dissipação de energia na forma de calor (Krause & Weis, 1991). No entanto, entre os diversos parâmetros da fluorescência da clorofila a que podem ser obtidos, alguns deles podem não ser preditivos para indicar o início do aparecimento dos sintomas de uma doença conforme foi observado para o parâmetro F_v/F_m . No presente estudo, observaram-se diminuições iniciais nos valores de A aos 1 dai, as quais não foram acompanhadas por qualquer alteração nos valores de F_0 ou F_m e, por consequência, nos valores de F_v/F_m . Similarmente, Tatagiba et al. (2015) não observaram alterações em F_v/F_m com o decréscimo em A em folhas de arroz nas primeiras horas após a inoculação com *Monographella albescens*.

Com o desenvolvimento do CBC e a redução progressiva nos valores de A , a utilização fotoquímica da energia da luz através de reações de fixação de carbono foi continuamente reduzida, acarretando perda gradual dos pigmentos fotossintéticos. Considerando que essas respostas foram acompanhadas por decréscimos em F_v/F_m e aumentos em $Y(NPQ)$, e pela correlação negativa da severidade com os parâmetros $Y(II)$, q_P , q_L e ETR , aventa-se que a capacidade de fotoproteção foi perdida, resultando, assim, em um aumento dos danos fotooxidativos no tecido das folhas cotiledonares. Além disso, o aumento do dano fotooxidativo no tecido das folhas cotiledonares pode também estar associado com os aumentos progressivos nos valores de $Y(NO)$, sugerindo, portanto, que tanto a energia de excitação dirigida à conversão fotoquímica e os mecanismos de regulação da proteção tornaram-se fisiologicamente ineficazes (Klughammer & Schreiber, 2008). Levando em consideração todas as alterações nos parâmetros examinados, obteve-se perda quase que completa das propriedades ópticas dos tecidos das folhas cotiledonares colonizados por Xapf e, em última análise, a destruição quase que completa do aparelho fotossintético.

No presente estudo, verificou-se que o aparato fotossintético foi afetado nos tecidos assintomáticos das folhas cotiledonares. De acordo com Tatagiba et al. (2015), houve reduções nos valores dos parâmetros q_P e $Y(II)$ em áreas nas folhas de arroz que ainda não apresentaram os sintomas da escaldadura, causada por *M. albescens*.

Entre os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, F_v/F_m é um excelente indicador do nível de estresse da planta por refletir a eficiência quântica do PSII (Maxwell & Johnson, 2000). Em plantas não estressadas, os valores desse parâmetro são em torno de 0,8, e valores menores indicam a ocorrência de fotoinibição e dano no FSII (Björkman & Powles, 1984; Araújo & Deminiciis, 2009). No presente estudo foi demonstrado que os valores de F_v/F_m permaneceram inalterados nas áreas assintomáticas. Esta constatação está em contraste com o que foi relatado para a interações *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* e *Nicotiana benthamiana*-*P. syringae*, em que os valores de F_v/F_m diminuíram significativamente mesmo no tecido foliar assintomático (Bonfig et al., 2006; Iqbal et al., 2012).

A redução no desempenho fotossintético das folhas cotiledonares das plantas inoculadas com Xapf provavelmente gerou um excedente de energia resultante da luz absorvida pelos cloroplastos. A fotorrespiração e a via Mehler-peroxidase podem fornecer proteção para o excesso de luz por atuarem na dissipação do excesso de

energia no aparato fotossintético ocorrendo, assim, uma redução fotossintética do O₂ (Biehler & Fock 1996). Com esses danos ao aparato fotossintético e a outras estruturas da célula, uma maior quantidade de EROs pode ocorrer na célula. Dessa forma, as plantas apresentam sistemas enzimáticos para manter os níveis de EROs constantes no interior das suas células (Scandalios, 1993). A maior atividade da SOD nas folhas cotiledonares infectadas por Xapf pode ter contribuído para a proteção contra o estresse oxidativo. Como esperado, a atividade da SOD aumentou nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas com Xapf, ao contrário do que foi observado nas folhas cotiledonares das plantas não inoculadas. Diversos autores relataram aumento na atividade das SOD em resposta à infecção por patógenos. Em tomateiro, foi demonstrado que a atividade da SOD peroxissomal foi maior na fase inicial da infecção por *Botrytis cinerea*, mas decresceu com o desenvolvimento das lesões necróticas causadas por *B. cinerea* (Kuzniak & Sklodowska, 2005). Essa observação contradiz o que foi observado no presente estudo no qual houve aumento na atividade da SOD nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas com o desenvolvimento do CBC em relação às folhas cotiledonares das plantas não inoculadas. De acordo com Debona et al. (2012), a atividade da SOD aumentou nas folhas de trigo infectadas por *P. oryzae* em comparação com as folhas das plantas não inoculadas. A atividade da SOD teve um aumento mais evidente nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas da cultivar DN em relação a cultivar ON. Em morangueiro infectado por *Mycosphaerella fragariae* também houve aumento na atividade da SOD, o qual foi mais pronunciado nas folhas das plantas das cultivares resistentes do que nas cultivares mais suscetíveis (Ehsani-Moghaddam et al., 2006), corroborando com os dados do presente estudo.

Nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas das duas cultivares houve aumento na atividade das enzimas POX e APX durante o processo infeccioso de Xapf. Uma maior atividade da POX foi importante para reduzir o estresse oxidativo resultante da infecção por Xapf. Além do envolvimento da POX na remoção do H₂O₂, essa enzima também apresenta importante papel na defesa das plantas contra a infecção por patógenos devido à sua participação na biossíntese da lignina e, conseqüentemente, fortalecimento da parede celular (Rauyaree et al., 2001). Debona et al. (2012) constataram que uma maior atividade da POX foi uma estratégia importante das plantas de trigo em resposta à infecção por *P. oryzae*. Hong-xia et al.

(2011) determinaram as atividades das enzimas POX, GST, CAT e SOD em plantas de cultivares de trigo resistentes e suscetíveis a *Rhizoctonia cerealis* e concluíram que uma maior atividade da POX esteve associada com a maior resistência das plantas. Na interação trigo-*P. oryzae*, a maior atividade da POX no estágio final da infecção pelo fungo também foi importante na resistência do trigo à brusone (Xavier Filha et al., 2011). Esses relatos concordam com os resultados do presente estudo em que houve aumento na atividade da POX, principalmente nas plantas da cultivar DN nos estágios finais da infecção por *Xapf*.

A remoção do excesso de H_2O_2 pela APX é o primeiro passo do ciclo ascorbato-glutationa (Foyer & Halliwell, 1976; Asada, 1994). Esse ciclo compreende uma série de reações redox envolvendo, além da APX, as enzimas redutase do monodesidroascorbato (MHAR), redutase do desidrosascorbato (DHAR) e a GR (Foyer & Halliwell, 1976; Nakano & Asada, 1981). A APX é responsável pela remoção do H_2O_2 nos cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias (Quan et al., 2008) utilizando o ascorbato como doador de elétrons específico para reduzir o H_2O_2 à água (Asada, 1992). O aumento na expressão do gene APX e na atividade dessa enzima durante diferentes interações patógeno-hospedeiro tem sido bem documentado na literatura (El-Zahabi et al., 1995; Hüchelhoven et al., 2001; Sarowar et al., 2005; Harrach et al., 2008). No presente trabalho, a atividade da APX aumentou nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas comparadas com as folhas cotiledonares das plantas não inoculadas, porém este aumento foi mais pronunciado nas plantas da cultivar DN do que nas plantas da cultivar ON. Aumento na expressão do gene APX foi observado em folhas de cevada infectadas por *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Hüchelhoven et al., 2001). Harrach et al. (2008) observaram que as alterações nas atividades da maioria das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo tais como a POX, APX e GST nas folhas de plantas de cevada foram similares após inoculação com *B. graminis* f. sp. *hordei*.

No presente estudo, houve aumento na concentração H_2O_2 nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas em relação às folhas cotiledonares das plantas não inoculadas, o que correspondeu à uma maior concentração de MDA nas plantas da cultivar ON. Uma maior concentração de EROs em plantas de tomateiro infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* resultou em uma maior peroxidação de lipídeos (Mandal et al., 2008). A extensão do dano celular causado pelo estresse

oxidativo relacionado à resposta das plantas à infecção por patógenos pode ser estimada pelos produtos da peroxidação dos lipídeos de membrana (Mandal et al., 2008; Iturbe-Ormaetxe et al., 1998; Fu & Huang, 2001). A maior resistência das plantas da cultivar DN à infecção por Xapf foi refletido numa menor peroxidação de lipídeos, como indicado pela menor concentração de MDA nas folhas cotiledonares. As maiores atividades da SOD, POX e APX nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas da cultivar DN em relação às plantas inoculadas da cultivar ON resultaram em redução na concentração de MDA e, assim, em menor danos celular decorrente da infecção por Xapf.

Os resultados do presente trabalho indicaram, pela primeira vez, que a fotossíntese, seja estimada pelas trocas gasosas ou por meio da fluorescência da clorofila a, das folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro da cultivar mais suscetível foi decrescida em decorrência do processo infeccioso de Xapf em comparação com a cultivar mais resistente. Pela análise da fluorescência da clorofila a foi possível detectar alterações na capacidade fotossintética das plantas de feijoeiro antes mesmo do aparecimento dos sintomas do CBC. Após a ocorrência do período de incubação, alterações nos parâmetros da fluorescência da clorofila a foram possíveis de serem notadas nas áreas assintomáticas das folhas cotiledonares. Adicionalmente, verificou-se que um sistema antioxidativo eficiente na remoção do excesso de EROs formado durante o processo infeccioso de Xapf, o que passa a limitar os danos celulares decorrentes da infecção pela bactéria, foi importante para garantir uma maior resistência ao CBC. O conhecimento das alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas de feijoeiro infectadas por Xapf tornam-se de fundamental importância para que novas estratégias de controle do CBC possam ser implementadas.

REFERÊNCIAS

Alscher R.G., Erturk N. & Heath I.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SOD) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*. **53**, 1331-1341.

Alves A.A., Guimarães L.M.S., Chaves A.R.M., DaMatta F.M. & Alfenas A.C., 2011. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum*. **33**, 1831-1839.

Apel K. & Hirt H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. **55**, 373-99.

Araújo S.A.C. & Deminicis B.B., 2009. Fotoinibição da Fotossíntese, *Revista Brasileira de Biociências*. **7**, 463-472.

Asada K., 1992. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*. **85**, 235-241.

Asada K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (eds) *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense system in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-103.

Asada K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **50**, 601-639.

Baker N.R., Oxborough K., Lawson T. & Morison J.I.L., 2001. High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *Journal of Experimental Botany*. **52**. 615-621.

Bassanezi R.B., Amorim L., Filho A.B. & Berger R.D., 2002. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *Journal of Phytopathology*. **150**, 37-47.

Bastiaans L., 1991. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology*. **81**, 611-615.

Bastiaans L. & Roumen E.C., 1993. Effect on leaf photosynthetic rate by leaf blast for rice cultivars with different types and levels of resistance. *Euphytica*. **66**, 81-87.

Beauchamp C. & Fridovich I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. **44**, 276-87.

Biehler K. & Fock H.P., 1996. Evidence for the contribution of the Mehlerperoxidase reaction in dissipation of excess electrons in drought stressed wheat. *Plant Physiology*. **112**, 265–272.

Björkman O. & Powles S.B., 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta*. **161**, 490-504.

Bonfig K.B., Schreiber U., Gabler A., Roitsch T. & Berger S., 2006. Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta*. **225**, 1-12.

Chance B. & Maehley A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. **2**, 764-75.

Chauhan R. S., Singh B. M. & Develash R. K., 1997. Effect of toxic compounds of *Exserohilum turcicum* on chlorophyll content, callus growth and cell viability of susceptible and resistant inbred lines of maize. *Journal Phytopathology*. **145**, 435-440.

Clark R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **23**, 458–460.

Dallagnol L.J., Rodrigues F.A., Martins S.C.V., Cavatte P.C. & DaMatta F.M., 2011. Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathology*. **40**, 360-365.

Darrasse A., Bureau C., Samson R., Morris C.E. & Jacques M., 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial

densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *European Journal Plant Pathology*. **119**, 203-215.

Debona D., Rodrigues F.A., Rios J.A. & Nascimento K.J.T., 2012. Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*. **102**, 1121–1129.

Debona D., Rodrigues F.A., Rios J.A., Martins S.C.V., Pereira L.F. & DaMatta F.M., 2014. Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology*. **104**, 3-39.

Del Longo O.T., González C.A., Pastori G.M. & Trippi V.S., 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology*. **34**, 1023-28.

Diaz C.G., Bassanezi R.B., Godoy C.V., Lopes D.B. & Bergamin Filho A., 2001, Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*. **26**, 71-76.

Dinis L.T., Peixoto F., Zhang C., Martins L., Costa R. & Gomes-Laranjo J., 2011. Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (*Castanea*) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **75**, 146-156.

Duniway J.M. & Durbin R.D., 1971. Some effects of *Uromyces phaseoli* on the transpiration rate and stomatal response of bean leaves. *Phytopathology*. **61**, 114-119.

Dursun A., Donmez M.F. & Sahin F., 2002. Identification of resistance to common bacterial blight disease on bean genotypes grown in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*. **108**, 811-813.

Ehsani-Moghaddam B., Charles M.T., Carisse O. & Khanizadeh S., 2006. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. *Journal Plant Physiology*. **163**, 147–153.

El-Zahabi H.M., Gullner G. & Királi Z., 1995. Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Phytopathology*. **85**,1225-1230.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. Informativo anual das comissões técnicas regionais de feijão: cultivares recomendadas para plantio no ano agrícola. 29.

Erickson J.E, Stanosz G.R. & Kruger E.L., 2003. Photosynthetic consequences of Marssonina leaf spot differ between two poplar hybrids. *New Phytologist*. **161**, 577-583.

Fernandez F., Gepts, P. & Lopez, M., 1986. Etapas de desarrollo de la planta de fríjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). CIAT, 1-34.

Foyer C.H. & Halliwell B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**, 21-25.

Fu J. & Huang B., 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. **45**, 105-114.

Gay C. & Gerbicki J.M., 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*. **284**, 217-220.

Giannopolitis C.N. & Ries S.K., 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. **59**, 309-314.

Gilbertson R.L., Rand R.E. & Carlson E., 1988. The use of dry-leaf inoculum for establishment of common bacterial blight of bean. *Plant Disease*. **72**, 385-389.

Gill S.S. & Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. **48**, 909-930.

Godoy C.V., Amorim L. & Bergamin Filho A., 2001. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. *Fitopatologia Brasileira*. **26**, 209-215.

Harrach B.D., Fodor J., Pogány M., Preuss J. & Barna B., 2008. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology*. **121**, 21-33.

Hartley H.O., 1950. The use of range in analysis of variance. *Biometrika*. **37**: 271-280.

Heath R.L. & Packer L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **125**, 189-198.

Hong-xia L., Zhi-yong X. & Zeng-yan Z., 2011. Changes in activities of antioxidant related enzymes in leaves of resistant and susceptible wheat inoculated with *Rhizoctonia cerealis*. *Agricultural Sciences in China*. **10**, 526-533.

Hückelhoven R., Dechert C., Trujillo M. & Kogel K.H., 2001. Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*. **47**, 739-748.

Iqbal M.J., Goodwin P.H., Leonardos E.D. & Grodzinski B., 2012. Spatial and temporal changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Plant Pathology*. **61**, 1052-1062.

Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese-Igor C. & Becana M., 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*. **116**, 173-181.

Kado C.I. & Heskett M.G., 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. **60**, 969-979.

Kar M. & Mishra D., 1976. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. **57**, 315-334.

Klughammer C. & Schreiber U., 2008. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. *PAM Application Notes*. **1**, 27-35.

Kobayashi L., Souza R.M. & Santos J.B., 1999. Avaliação de cultivares e linhagens de feijoeiro quanto à reação foliar e de vagens à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. *Ciência e Agrotecnologia*. **23**, 40-47.

Krause G. H. & Weis E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **42**, 313-349.

Kumudini S., Prior E., Omielan J. & Tollenaar M., 2008. Impact of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean leaf photosynthesis and radiation absorption. *Crop Science*. **48**, 2343–2350.

Kuo M.C. & Kao C.H., 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*. **46**, 149-152.

Kuzniak E. & Sklodowska M., 2005. Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta*. **222**, 192-200.

Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. **148**, 350–382.

Mahuku G.S., Jará, C., Henríquez M.A., Castellanos G. & Cuasquer J., 2006. Genotypic characterization of the common bean bacterial blight pathogens, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* by rep-PCR-RFLP of ribosomal genes. *Journal of Phytopathology*. **154**, 35-44.

Mandal S., Mitra A. & Mallick N., 2008. Biochemical characterization of oxidative burst during interaction between *Solanum lycopersicum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **72**, 56-61.

Maringoni A.C., Fregonese L.H., Tófoli J.G. & Kurosawa C., 1993. Reação foliar e da vagem de feijoeiro à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e transmissão da bactéria pelas sementes. *Fitopatologia Brasileira*. **18**, 412-417.

McGrath M.T. & Pennypacker S.P., 1990. Alteration of physiological processes in wheat flag leaves caused by stem rust and leaf rust. *Phytopathology*. **80**, 677-686.

Maxwell K. & Johnson G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. **51**, 659 - 668.

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

Moriondo M., Orlandini S., Giuntoli A. & Bindi M., 2005. The effect of downy and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. *Journal Phytopathology*. **153**, 350-357.

Mutlu N., Miklas P., Reiser J. & Coyne D., 2005. Backcross breeding for improved resistance to common bacterial blight in pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Breeding*. **124**, 282-287.

Nakano Y. & Asada K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*. **22**, 867-80.

Quan L.J., Zhang B., Shi W.W. & Li H.Y., 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*. **50**, 2-18.

Rauyaree P., Choi W., Fang E., Blackmon B. & Dean R., 2001. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology*. **2**, 347-354.

Rava C. A., Sartorato A. & Romeiro R. S., 1990. Avaliação de cultivares de feijoeiro quanto à resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em condições de campo e de casa de vegetação. *Summa Phytopathologica*. **16**, 83-91.

Resende R.S., Rodrigues F.A., Cavatte P.C., Martins S.C.V., Moreira R.M., Chaves A.R.M. & DaMatta F.M., 2012. Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology*. **102**, 892-898.

Robert C., Bancal M.O., Ney B. & Lannou C., 2005. Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytologist*. **165**, 227-241.

Rodrigues R., Leal N.R., Pereira M.G. & Lam-Sánchez A., 1999. Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. *Genetics and Molecular Biology*. **22**, 571-575.

Rolfe S.A. & Scholes J.D., 2010. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma*. **247**, 163–175.

Romeiro R.S., 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV. 1-279.

Sarowar S., Kim E.N., Kim Y.J., Ok S.H., Kim K.D., Hwang B.K. & Shin J.S., 2005. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Science*. **169**, 55-63.

Scandalios J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*. **101**, 7-12.

Tatagiba S.D., DaMatta F.M. & Rodrigues F.A., 2015. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence imaging of rice leaves infected with *Monographella albescens*. *Phytopathology*. **105**, 180-188.

Torres J.P., Silva Júnior T.A.F. & Maringoni A.C., 2009. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. *Summa Phytopathologica*. **35**, 136-139.

Vale F.X.R., Fernandes Filho E.I. & Liberato J.R., 2003. A software plant disease severity assessment. In: Close R., Braithwaite M., Havery I., eds. *Proceedings of Eighth International Congress of Plant Pathology*, Christchurch, New Zealand. Sydney, Australia: Horticulture Australia, 107.

Xavier Filha M.S., Rodrigues F.A., Domiciano G.P., Oliveira H.V., Silveira P.R. & Moreira W.R., 2011. Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. *Australasian Plant Pathology*. **40**, 28-38.

Yan B., Dai Q., Liu X., Huang S. & Wang Z., 1996. Flooding induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil*. **179**, 261-268.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. P valores dos efeitos dos fatores cultivar (C), infiltração das plantas (I) e experimento (E) e das interações entre esses fatores para severidade do cretamento bacteriano (Sev), área da lesão (AL), taxa líquida de assimilação de CO₂ (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E), concentração de clorofila total (Chl a+b) e de carotenoides (Car), atividades da superóxido dismutase (SOD), das peroxidases (POX) e ascorbato peroxidase (APX), além das concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aldeído malônico (MDA).

Variáveis	C	I	E	C × I	C × E	I × E	C × I × E
Sev	< 0,001	-	0,712	-	0,531	-	-
AL	< 0,001	-	0,149	-	0,170	-	-
A	< 0,001	< 0,001	0,352	< 0,001	0,559	0,080	0,399
g _s	< 0,001	< 0,001	0,618	0,002	0,714	0,895	0,081
E	< 0,001	< 0,001	0,237	< 0,001	0,653	0,814	0,275
Chl a+b	0,042	< 0,001	0,750	0,022	0,778	0,670	0,757
Car	0,023	< 0,001	0,858	0,003	0,997	0,628	0,903
SOD	0,696	0,003	-	0,017	-	-	-
POX	0,641	0,001	-	0,028	-	-	-
APX	0,851	0,002	-	0,015	-	-	-
H ₂ O ₂	0,021	<0,001	-	0,757	-	-	-
MDA	0,186	0,001	-	0,048	-	-	-

Tabela 2. P valores dos efeitos dos fatores experimento (E), cultivar (C), infiltração das plantas (I) e áreas em relação ao ponto de inoculação (A) e das interações entre esses fatores para a área abaixo da curva de fluorescência da clorofila a aos 14 dias após inoculação das plantas de feijoeiro com *Xanthomonas axonopodis* var. *fuscans*.

Fontes de variação	P valores
E	0,738
C	0,307
I	< 0,001
E × C	0,970
E × I	0,487
C × I	0,001
E × C × I	0,621
A	< 0,001
A × E	0,886
A × C	0,340
A × I	< 0,001
A × E × C	0,884
A × E × I	0,957
A × C × I	0,601
A × E × C × I	0,849

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson dos parâmetros fluorescência máxima [F_m], fluorescência inicial [F_0], eficiência fotoquímica máxima do PSII [F_v/F_m], eficiência quântica do PSII [$Y(II)$], rendimento quântico de dissipação de energia regulada [$Y(NPQ)$], rendimento quântico de dissipação de energia não regulada [$Y(NO)$], quenching não-fotoquímico (NPQ), coeficiente de quenching não-fotoquímico (q_N), coeficiente de extinção fotoquímico [q_P], coeficiente de quenching fotoquímico [q_L] e taxa de transporte de elétrons (ETR) determinados na área intermediária entre a área assintótica e a área necrótica (A2) e a área assintótica (A3) com a severidade (Sev) e a área da lesão (AL).

Variáveis	F_m	F_0	F_v/F_m	$Y(II)$	$Y(NPQ)$	$Y(NO)$	NPQ	q_N	q_P	q_L	ETR
<u>Área A2</u>											
Sev	0,38	0,27	-0,14	-0,72*	0,32	0,13	-0,05	0,28	-0,73*	-0,79*	-0,67*
AL	0,18	0,40	-0,25	-0,82*	0,19	0,41	-0,24	0,05	-0,65*	-0,82*	-0,80*
<u>Área A3</u>											
Sev	0,16	0,46	-0,20	-0,72*	0,68*	-0,41	0,42	0,61*	-0,68*	-0,60*	-0,79*
AL	0,23	0,40	-0,09	-0,70*	0,64*	-0,32	0,40	0,56*	-0,69*	-0,67*	-0,76*

* $P < 0,05$.

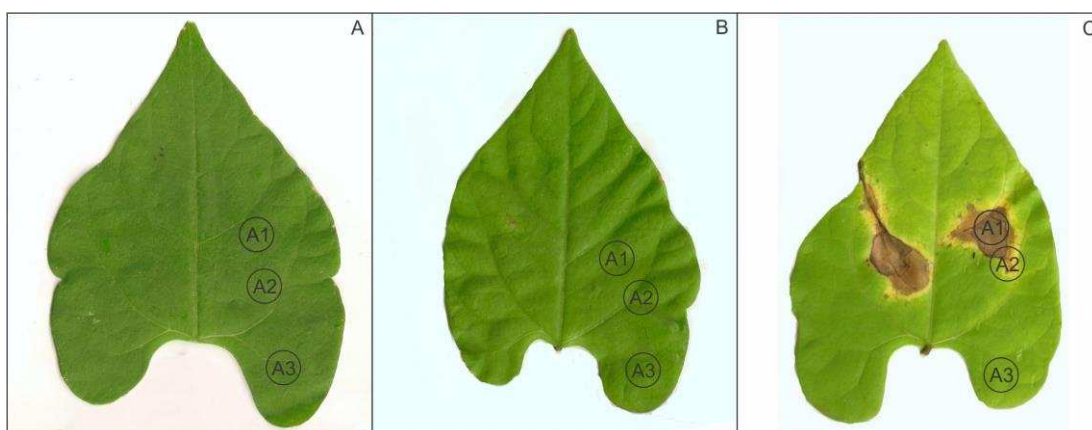


Figura 1. Representação esquemática das folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro sem infiltração (A), infiltrada com solução salina (B) e infiltradas com suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* em que os círculos representam a área avaliada. Folhas cotiledonares das plantas sem infiltração, as três áreas foram escolhidas ao acaso. Nas folhas cotiledonares das plantas infiltradas com solução salina, as áreas foram assim definidas: área infiltrada (A1), área intermediária entre a região infiltrada e não infiltrada (A2) e área distante do local de infiltração (A3). Já nas plantas infiltradas com solução de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* as áreas foram definidas como: Área necrótica (A1), área intermediária entre a área assintomática e a área necrótica (A2) e área assintomática (A3).

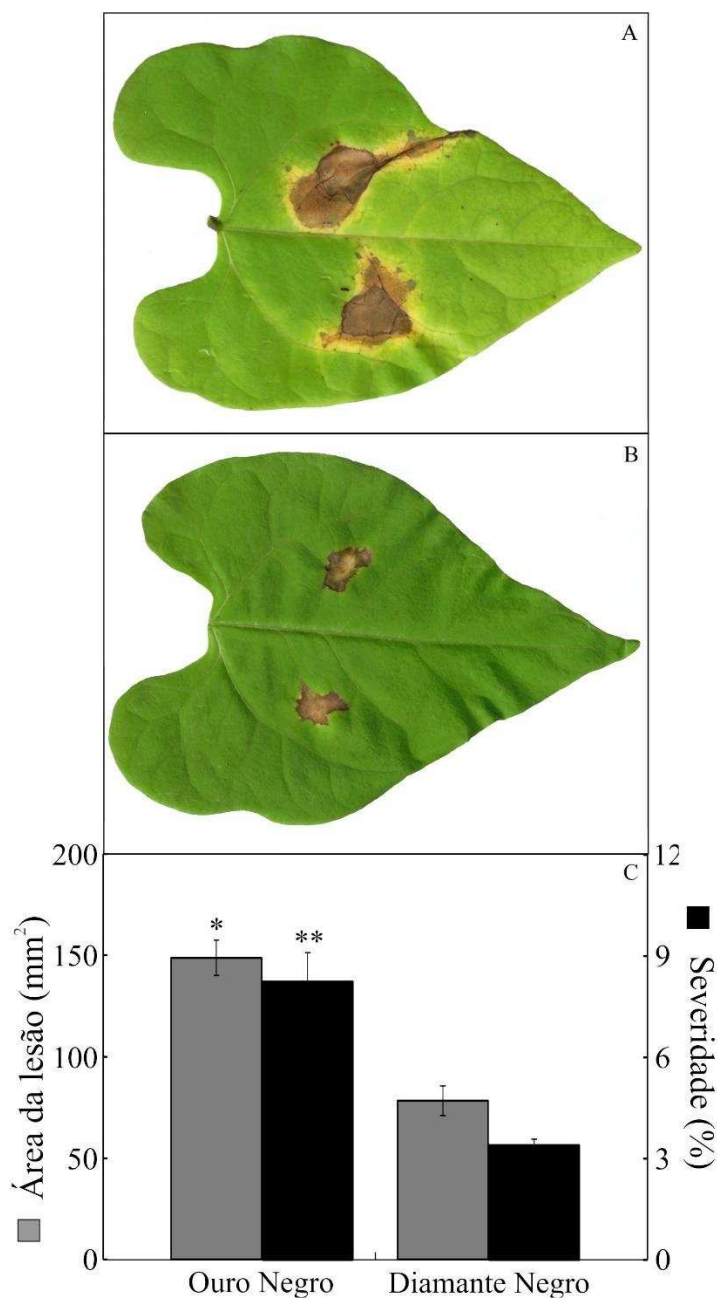


Figura 2. Sintomas do crestamento bacteriano comum nas folhas cotiledonares de plantas das cultivares Ouro Negro (A) e Diamante Negro (B). Área da lesão e severidade do crestamento bacteriano nas folhas cotiledonares das plantas das cultivares Ouro Negro e Diamante Negro aos 14 dias após inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (C). Médias seguidas de um (*) e dois asteriscos (**) indica diferença significativa entre as cultivares ($P \leq 0,05$) para área da lesão e severidade, respectivamente, com base no teste F. Barras de erro representam os desvios padrão das médias. $n = 12$.

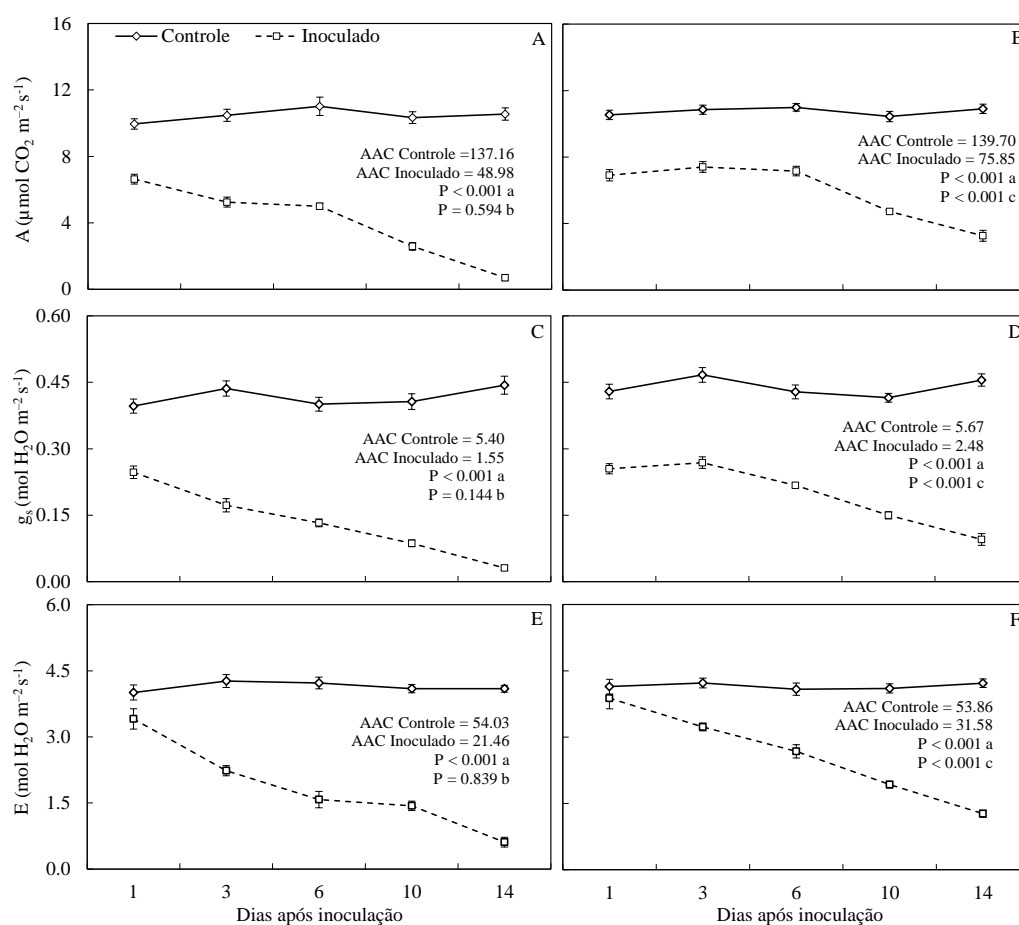


Figura 3. Parâmetros de trocas gasosas taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) (A e B), condutância estomática (g_s) (C e D) e transpiração (E) (E e F) determinadas nas folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro das cultivares Ouro Negro (A, C e E) e Diamante Negro (B, D e F) infiltradas com solução salina ou inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. A partir dos valores de A, g_s e E para cada cultivar, calculou-se as áreas abaixo da curva (AAC) para cada um dos parâmetros de trocas gasosas. Barras de erro representam os desvios padrão das médias. Dados de dois experimentos combinados. As letras a, b e c indicam, respectivamente, comparação entre plantas não inoculadas e inoculadas para cada cultivar; entre as plantas não inoculadas das duas cultivares e entre as plantas inoculadas das duas cultivares. n = 8.

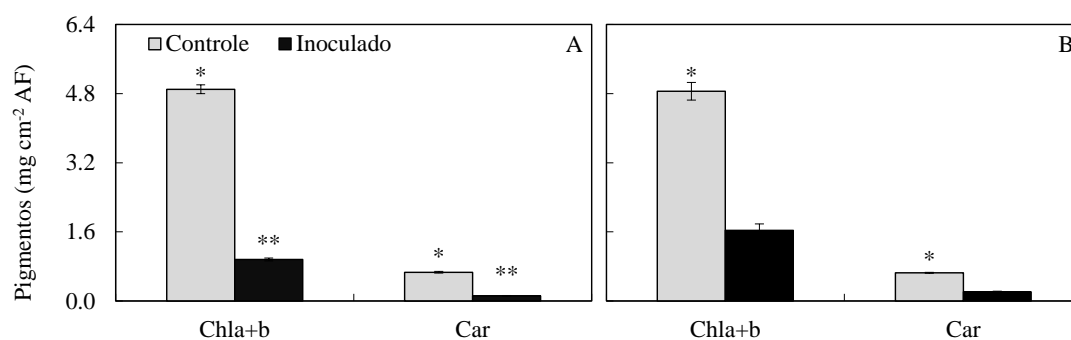


Figura 4. Concentrações de clorofila total (Chla+b) e de carotenóides (Car) determinadas em folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro das cultivares Ouro Negro (A) e Diamante Negro (B) infiltradas com solução salina e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. Médias seguidas de um (*) e dois asteriscos (**) indica diferença significativa entre as cultivares ($P \leq 0,05$) para clorofila total e carotenóides, respectivamente, com base no teste F. Barras de erro representam os desvios padrão das médias. $n = 8$. AF = área foliar.

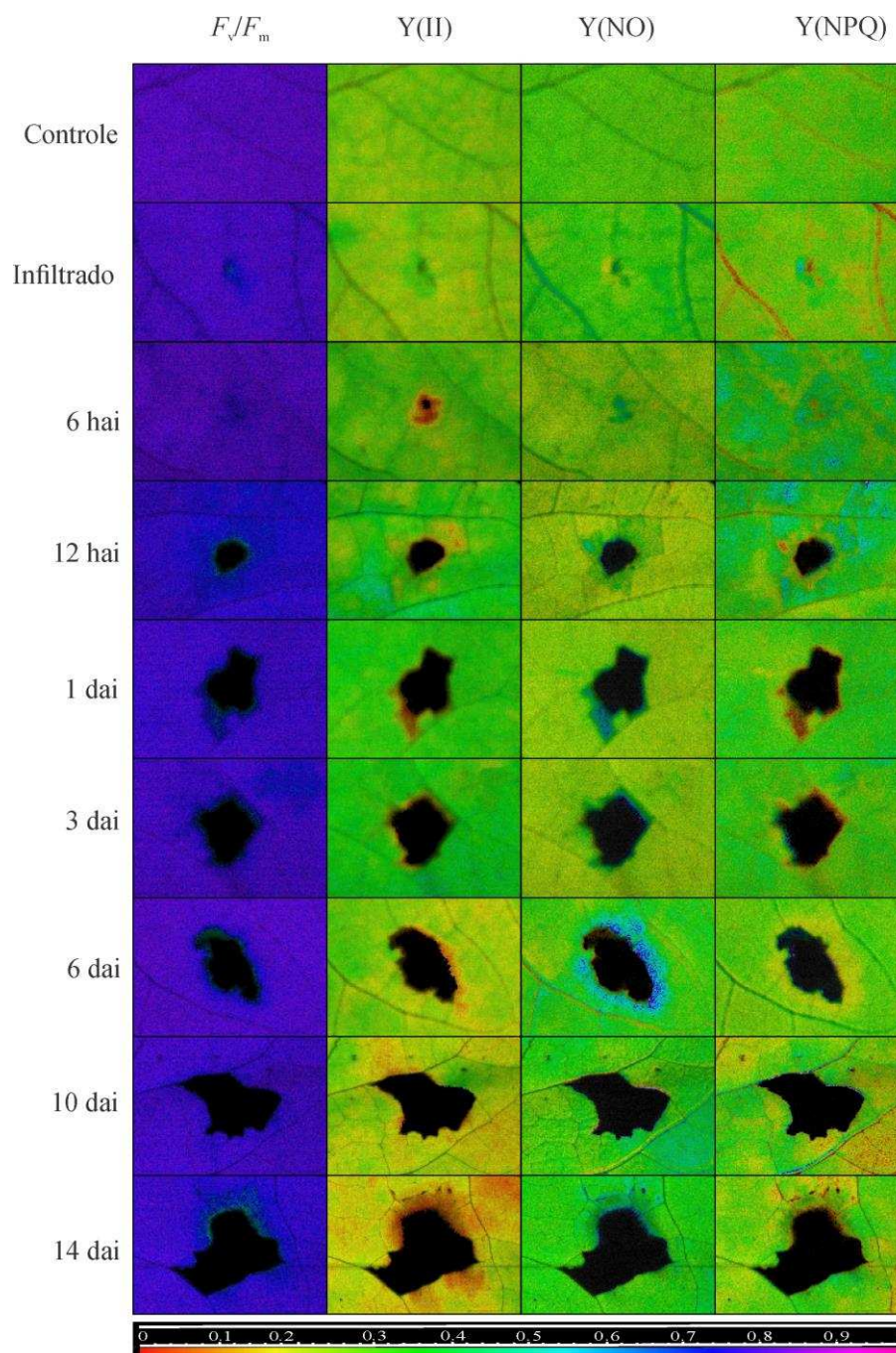


Figura 5. Imagens dos parâmetros de fluorescência da clorofila a rendimento quântico máximo do fotossistema II [F_v/F_m], eficiência quântica do PSII [$Y(II)$], rendimento quântico de dissipação de energia não regulada [$Y(NO)$] e rendimento quântico de dissipação de energia regulada [$Y(NPQ)$] obtidas de folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro da cultivar Ouro Negro não infiltrada, infiltradas com solução salina (infiltrado) e aos 6, 12 horas após inoculação (hai) e 1, 3, 6, 10 e 14 dias após inoculação (dai) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.

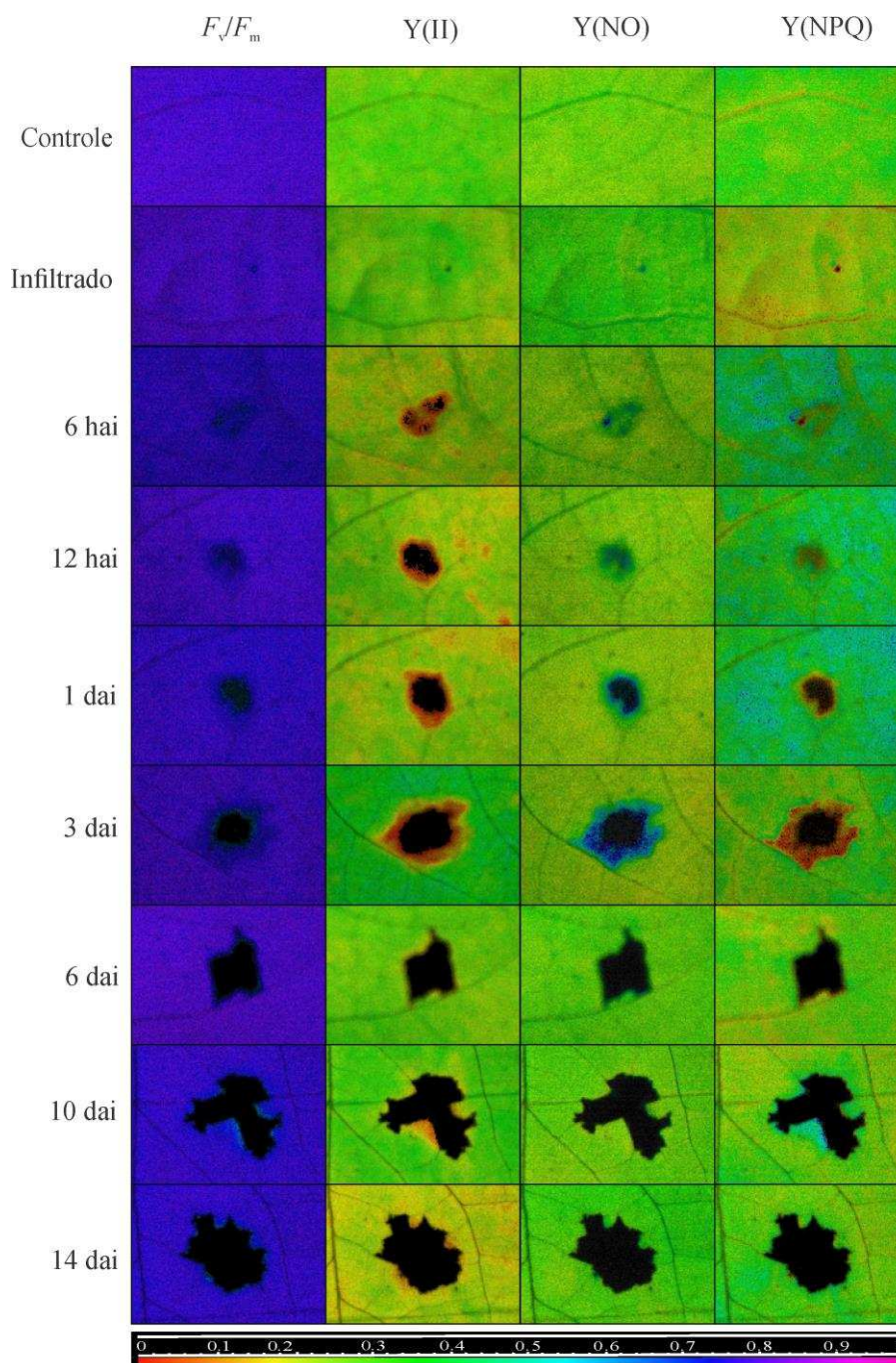


Figura 6. Imagens dos parâmetros de fluorescência da clorofila a rendimento quântico máximo do fotossistema II [F_v/F_m], eficiência quântica do PSII [Y(II)], rendimento quântico de dissipação de energia não regulada [Y(NO)] e rendimento quântico de dissipação de energia regulada [Y(NPQ)] obtidas de folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro da cultivar Diamante Negro não infiltrada, infiltradas com solução salina (infiltrado) e aos 6, 12 horas após inoculação (hai) e 1, 3, 6, 10 e 14 dias após inoculação (dai) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*.

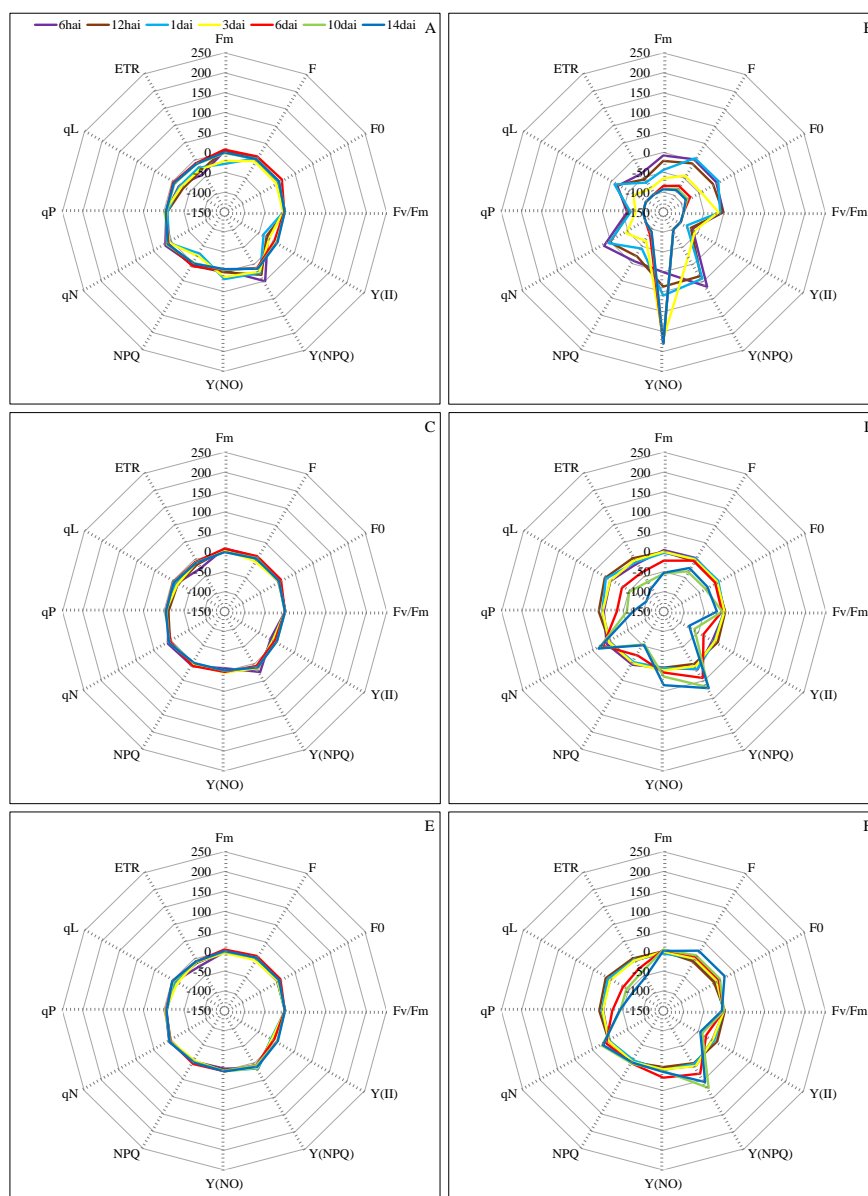


Figura 7. Alterações relativas nos valores médios dos parâmetros de fluorescência da clorofila a em folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro da cultivar Ouro Negro infiltradas com solução salina (A, C e E) e às 6 e 12 horas após inoculação (hai) e aos 1, 3, 6, 10 e 14 dias após inoculação (dai) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (B, D e F). As avaliações foram realizadas na área infiltrada com solução salina (A), área necrótica (B), área intermediária entre a região infiltrada e não infiltrada com solução salina (C), área intermediária entre a área assintomática e a área necrótica (D), área distante do local de infiltração com solução salina (E) e na área assintomática nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas (F).

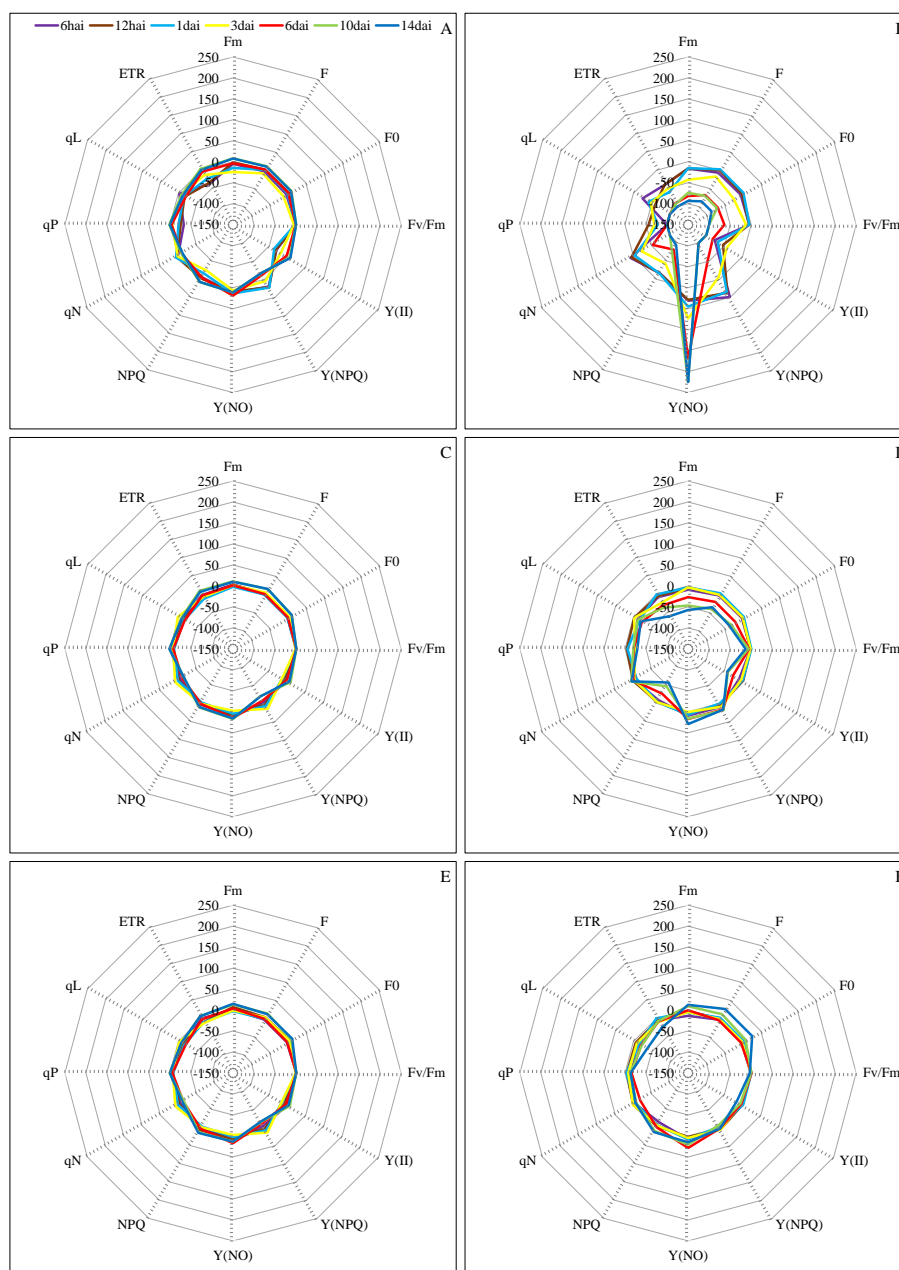


Figura 8. Alterações relativas nos valores médios dos parâmetros de fluorescência da clorofila a em folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro da cultivar Diamante Negro infiltradas com solução salina (A, C e E) e às 6 e 12 horas após inoculação (hai) e aos 1, 3, 6, 10 e 14 dias após inoculação (dai) com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (B, D e F). As avaliações foram realizadas na área infiltrada com solução salina (A), área necrótica (B), área intermediária entre a região infiltrada e não infiltrada com solução salina (C), área intermediária entre a área assintomática e a área necrótica (D), área distante do local de infiltração com solução salina (E) e na área assintomática nas folhas cotiledonares das plantas inoculadas (F).

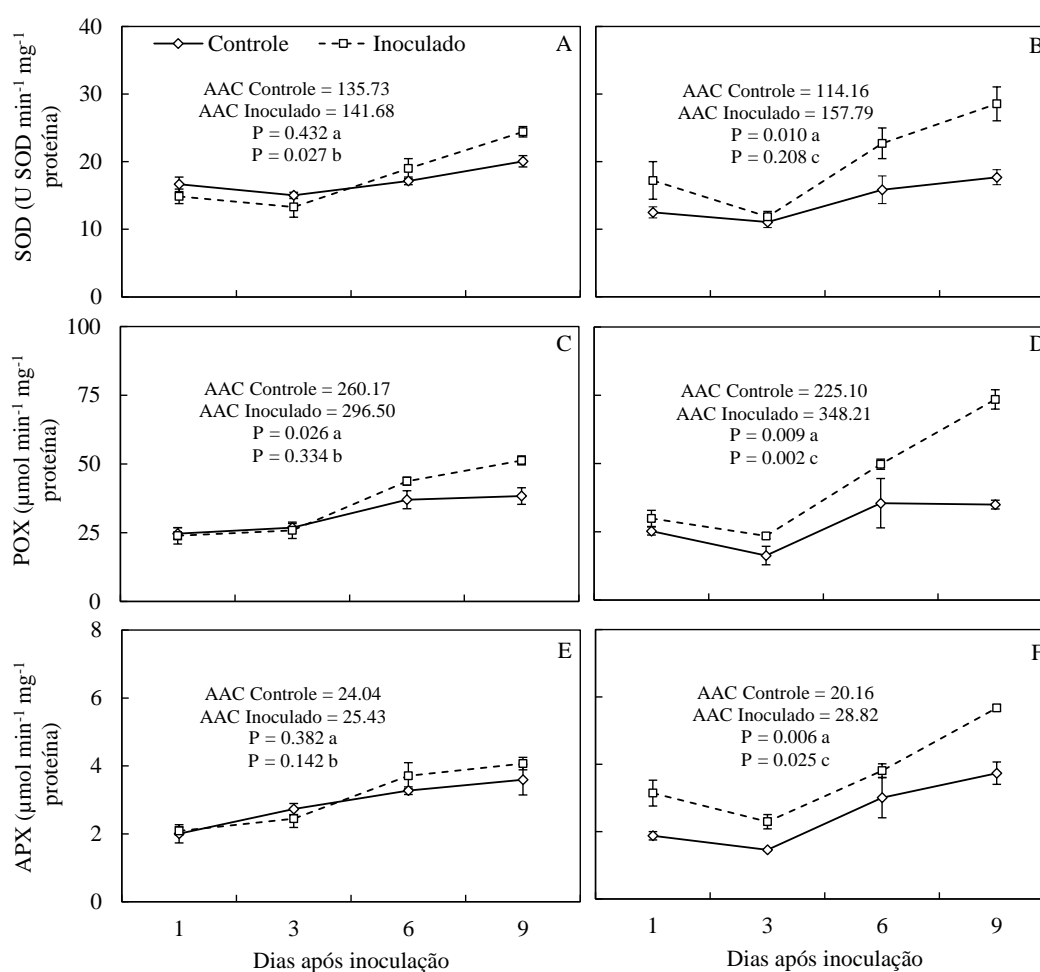


Figura 9. Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) (A e B), peroxidases (POX) (C e D) e ascorbato da peroxidase (APX) (E e F) determinadas em folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro das cultivares Ouro Negro (A, C e E) e Diamante Negro (B, D e F) infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. A partir dos valores das atividades da SOD, POX e APX para cada cultivar, calculou-se as áreas abaixo da curva (AAC) para cada uma das enzimas. Barras de erro representam os desvios padrão das médias. As letras a, b e c indicam, respectivamente, comparação entre plantas infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* para cada cultivar; entre as plantas infiltradas com solução salina das duas cultivares e entre as plantas infiltradas com suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* das duas cultivares. n = 4.

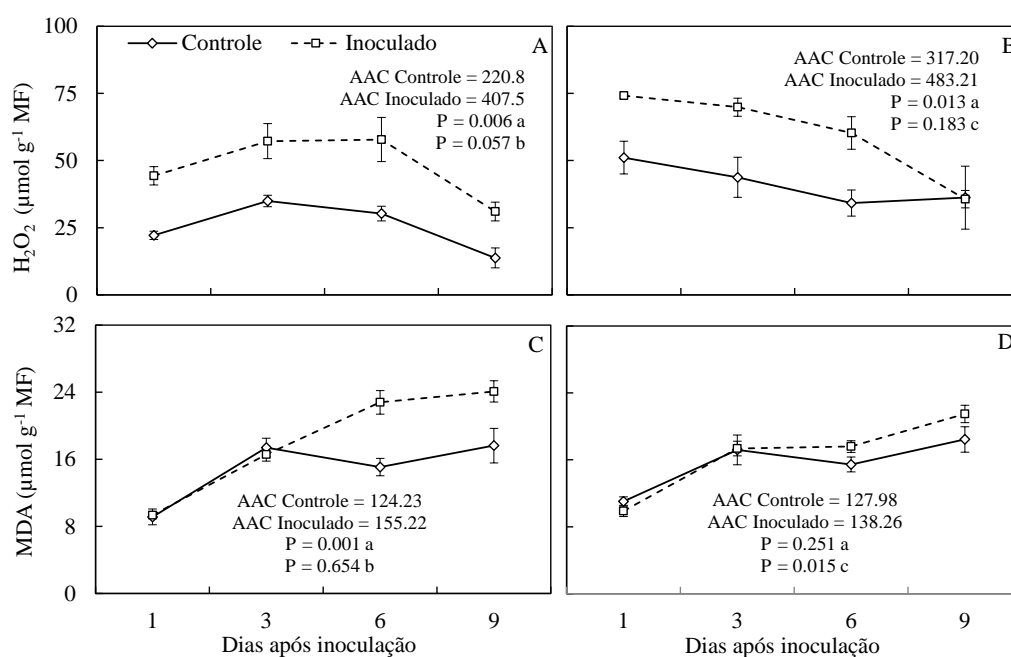


Figura 10. Concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (A e B) e de aldeído malônico (MDA) (C e D) determinadas em folhas cotiledonares de plantas de feijoeiro das cultivares Ouro Negro (A e C) e Diamante Negro (B e D) infiltradas com solução salina e infiltradas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*. A partir dos valores das atividades das concentrações de H_2O_2 e MDA para cada cultivar, calculou-se as áreas abaixo da curva (AAC) para cada um desses compostos. Barras de erro representam os desvios padrão das médias. As letras a, b e c indicam, respectivamente, comparação entre plantas infiltradas com solução salina e infiltradas com suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* para cada cultivar; entre as plantas infiltradas com solução salina das duas cultivares e entre as plantas infiltradas com suspensão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* das duas cultivares. $n = 4$.