



ISSN 0104-866X
Dezembro, 2001

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Avanços Tecnológicos no Feijão Caupi

V Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi
4 a 7 de dezembro de 2001

Anais

Organizadores:

Francisco Rodrigues Freire Filho
Embrapa Meio-Norte

Valdenir Queiroz Ribeiro
Embrapa Meio-Norte

Aderson Soares de Andrade Júnior
Embrapa Meio-Norte

Edson Alves Bastos
Embrapa Meio-Norte

Embrapa Meio-Norte

Teresina, PI

2001

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5650

Telefone: (86) 225-1141

Fax: (86) 225-1142. E-mail: publ@cpann.embrapa.br.

Caixa Postal 01

CEP 64006-220 Teresina, PI

Tratamento editorial: Lígia Maria Rolim Bandeira

Normalização bibliográfica: Jovita Maria Gomes Oliveira

Capa: Célio Marcos Martins de Oliveira

Tiragem: 600 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação aos direitos autorais (Lei nº 9.610)

CIP - Cotação na publicação
Embrapa Meio-Norte

Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, (5.: 2001. Teresina). Anais da 5ª
Reunião Nacional de Caupi [Organização de] Francisco Rodrigues
Freire Filho... [et al.]. Teresina, PI. Embrapa Meio-Norte, 2001.
343 p.; 28 cm - (Embrapa Meio-Norte. Documentos,
ISSN 0104-866X; 56)

I. Caupi, Tecnologia. 2. Feijão de corda - Tecnologia.
I. Freire Filho, Francisco Rodrigues. II Título. III Título: Avanço
Tecnológicos no Feijão Caupi. IV Série.

CDD. 635.6592063-21. ed

©Embrapa 2001

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.]

J. T. A. OLIVEIRA¹, N. C. ANDRADE¹, A. S. M. MIRANDA¹, A. L. H. BARRETO¹, V. M. M. MELO²,
C. F. FERNANDES¹, I. M. VASCONCELOS¹, J. A. G. SILVEIRA¹, F. R. CAVALCANTI¹,
F. R. FREIRE-FILHO³, F. C. O. FREIRE⁴ e F. J. T. GONÇALVES⁴

Resumo - As atividades peroxidásicas e β -1,3-glucanásica elicítadas por agentes causadores de doenças e pelo estresse hídrico em feijão-de-corda foram estudadas. Foi observado que a atividade peroxidásica, mas não a β -1,3-glucanásica foi induzida pelo tratamento das plantas com o nematóide *Meloidogyne incognita* e com o fungo *Colletotrichum gleosporioides* (agentes bióticos). Entretanto, no tratamento com o nematóide a planta respondeu de modo mais intenso do que com o fungo. Esta resposta sugere que a planta tenta se defender do ataque destes organismos através da fortificação da parede celular, processo no qual as peroxidases têm papel importantíssimo. Em relação ao estresse hídrico (abiótico), foi observado aumento tanto da atividade da peroxidase como da β -1,3-glucanase em relação aos controles. Os dados aqui apresentados sugerem que estas enzimas respondem a várias situações de estresse, tanto biótico como abiótico, e que, embora importantes para a fisiologia da planta, ocorrem de maneira inespecífica.

Palavras-chave: Feijão-de-corda, *Vigna unguiculata*, *Meloidogyne incognita*, *Colletotrichum gleosporioides*, estresse hídrico, peroxidase, β -1,3-glucanase.

PEROXIDASE AND β -1,3-GLUCANASE ACTIVITIES ELICITED BY BIOTIC AGENTS RESPONSABLE FOR DISEASES AND BY DROUGHT IN COWPEA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

Abstract - Peroxides and β -1,3-glucanase activities elicited by biotic agents which cause plant diseases and by the drought in cowpea were studied. It was observed that the peroxides but not the β -1,3-glucanase activity was induced by treatment of the plants with the nematode *Meloidogyne incognita* and with the fungus *Colletotrichum gleosporioides*. However, the challenge of the plant with *M. incognita* gave a more conspicuous response than with *C. gleosporioides*. Nevertheless both treatments elicited the peroxides activity suggesting that the plant tries to protect itself by hardening the cell wall. In the drought-stressed plants both enzyme activities were increased over those of controls. The currently data showed that the activity of these enzymes increased in response to various stress conditions and that such response, although important for the physiology of the plant, is inespecific.

Keywords: cowpea, *Vigna unguiculata*, *Meloidogyne incognita*, *Colletotrichum gleosporioides*, drought, peroxides, β -1,3-glucanase.

Introdução

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], subespécie *unguiculata*, também conhecido como feijão macassar ou caupi, se constitui numa das principais leguminosas cultivadas no Brasil, predominantemente nas Regiões Nordeste e Norte, onde é usado para fins alimentares. Dentre os vários fatores que limitam a produção do feijão-de-corda no Brasil, encontram-se as doenças causadas por agentes patogênicos (Rios, 1988). Os danos causados por estes organismos influenciam na quantidade do feijão produzido por hectare plantado, bem como na sua qualidade. O feijão-de-corda é considerado um dos principais hospedeiros dos nematóides de galhas (Ponte, 1988), destacando-se, dentre estes, as espécies *M. incognita* e *M. javanica*, cuja atuação impede o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo normais da planta. Uma outra doença, desta feita causada por fungos do gênero

¹Depto. Bioquímica e Biologia Molecular/CCA/UFC, Caixa Postal 6020, CEP 60451-970, Fortaleza, CE.

E-mail: jtaolive@ufc.br

²Depto. Microbiology, UFC. E-mail: vmmelo@ufc.br

³Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-220, Teresina, PI. E-mail: freire@cpamn.embrapa.br

⁴Embrapa-CE, Fortaleza, CE.

Colletotrichum causadores da antracnose, também, tem marcante contribuição na sua baixa produtividade. Entretanto, alguns cultivares-de-feijão de corda conseguem, de algum modo, se opor ao ataque destes patógenos, sendo, neste caso, classificados como resistentes.

De um modo geral, as plantas defendem-se da invasão de patógenos por diferentes meios que incluem certas reações bioquímicas celulares que resultam em toxicidade contra estes organismos ou criam condições adversas ao seu desenvolvimento normal no interior da planta. Diversos compostos são produzidos e/ou mobilizados, tais como, os metabólitos secundários, componentes não protéicos, proteínas, enzimas, incluindo as quitinases, as β -1,3-glucanases e as peroxidases (Gomes et al., 1996), dentre outros, logo após a invasão do parasita, sendo, portanto, considerados componentes que estão direta ou indiretamente envolvidos no mecanismo de defesa das plantas. As peroxidases participariam do processo de lignificação da parede celular e, provavelmente, da ativação de certas toxinas vegetais, impedindo ou retardando o ciclo reprodutivo dos patógenos (Bruce & West, 1989) enquanto que as β -1,3-glucanases, juntamente com as quitinases, ambas enzimas hidrolíticas, promoveriam a desorganização da parede celular dos patógenos invasores (Gianinazzi et al., 1970; Xue et al., 1998).

O estresse hídrico causa várias mudanças fisiológicas na planta, para que esta possa superar os períodos de seca. O feijão-de-corda apresenta excelentes características de tolerância para as condições estressantes de deficiência hídrica e elevadas temperaturas (Costa, 1999), características da região semi-árida. Entretanto, poucos são os trabalhos encontrados na literatura, que avaliam o comportamento fisiológico, os efeitos e os mecanismos bioquímicos referentes a essa resistência ao déficit de água.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os níveis de atividade peroxidásica e/ou β -1,3-glucanásica em genótipos de feijão-de-corda resistentes e suscetíveis à meloidoginose e à antracnose e sob estresse hídrico, ao longo do estabelecimento das plântulas.

Material e Métodos

Sementes quiescentes de feijão-de-corda resistente (cv. TE97-411-1E) e susceptível (cv. BR3-Tracuateua) à antracnose foram fornecidas pela EMBRAPA/Piauí. Os demais genótipos foram obtidos na Escola de Agronomia da UFC-CE. Meloidogine incógnita foi obtido de raízes de quiabeiros infectados. O fungo *C. gloeosporioides* foi proveniente da micoteca mantida no Laboratório de Microbiologia do Depto de Biologia da UFC. A cultura foi mantida em meio de ágar Sabouraud-glicose à temperatura de 8°C.

Para avaliação da resistência e suscetibilidade dos genótipos, sementes de doze variedades de feijão-de-corda foram plantadas, sob condições de campo, em solo reconhecidamente infestados com o referido nematóide, seguindo um delineamento em blocos casualizados, com 10 repetições. A coleta foi feita 60 dias após o plantio, quando foi examinado o sistema radicular de cada planta e efetuada a contagem do número de galhas e massa de ovos, de acordo com a escala de nota citada por Taylor & Sasser (1978). Aquelas que apresentaram um índice igual ou superior a três foram classificadas como resistentes e os genótipos CE-31 (resistente) e o CE-109 (susceptível) foram usados para os ensaios enzimáticos. Para determinação da atividade peroxidásica, as sementes de CE31 e CE109 foram plantadas em solo previamente esterilizado em autoclave, distribuídas na proporção de duas sementes por vaso e mantidas em câmara de germinação a uma temperatura média de 30°C. A inoculação foi feita aos 12 dias de idade, utilizando-se, como fonte de inóculo um total de 250 J2/planta. As coletas foram efetuadas a cada dois dias, a partir do segundo da inoculação.

Na inoculação com *C. gloeosporioides* as sementes de feijão-de-corda (TE97-411-1E e BR3-Tracuateua, resistente e susceptível, respectivamente, ao *C. lindemuthianum*) foram previamente tratadas com hipoclorito de sódio a 1% e, em seguida, lavadas abundantemente com água destilada, colocadas para germinar em vasos plásticos, utilizando-se areia previamente esterilizada como substrato. O cultivo foi feito em casa de vegetação, com temperatura em torno de 35°C. As plantas foram regadas com água destilada até o sétimo dia de plantio e, em seguida, com solução nutritiva modificada. Para obtenção de esporos de *C. gloeosporioides*, culturas em placas foram lavadas com 10 ml de água grau Milli-Q estéril e agitadas, manualmente, para liberação dos esporos. A suspensão de esporos foi coletada com pipeta Pasteur e lavada, sob centrifugação, com água estéril. O pellet foi retomado em água e a concentração de células determinada em câmara de Neubauer. Plantas sadias que não apresentavam injúria visível foram selecionadas e transferidas para uma câmara de crescimento a $30 \pm 5^\circ\text{C}$, com umidade em torno de 65%. Estas plantas foram, então, inoculadas com esporos de *C. gloeosporioides*, após 12 dias de plantio, enquanto que plantas não tratadas serviram de controle. Foram aplicadas 4 gotas de 25 μl de esporos na concentração de $10^5/\text{ml}$ nas folhas primárias, sendo 2 gotas de cada lado da nervura central. Nos controles usou-se água destilada. As plantas foram coletadas 6, 12, 18, 24, 30, e 36 h (TE 97) e 6, 12, 18, 24, e 30 h (BR3) após a inoculação, e o material usado para ensaios de atividade enzimática. Foram coletadas as folhas primárias, folhas

secundárias e os talos, separadamente, para observação da resposta hipersensitiva (HR) e resposta sistêmica adquirida (SAR).

O experimento do estresse hídrico foi conduzido em casa de vegetação, com temperatura e umidades médias mínimas (noite) e máximas (dia) variando de 25°C a 36°C e 39% a 85%, respectivamente. O substrato utilizado foi uma mistura de sílica e vermiculita na proporção de 1:2 (v:v), sendo a mesma lavada com água destilada por 5 vezes e, posteriormente, autoclavada por 20 min. Os vasos utilizados foram tipo Leonard modificados segundo a metodologia descrita por Costa (1999). Diariamente, as plantas receberam água e solução nutritiva pela parte superior até completar o volume da solução contida na parte inferior do vaso. No vigésimo oitavo dia após a emergência das plântulas, elas foram submetidas à retirada da água da parte inferior dos vasos e permaneceram apenas com a água retida na fase sólida da parte superior, durante 4 dias consecutivos. Após este período, foram reidratadas durante 2 dias, enquanto que as plantas controles permaneceram em presença de água. As plântulas foram coletadas durante sete dias consecutivos, após o tratamento. As folhas foram congeladas imediatamente com N₂ líquido e mantidas em freezer até a liofilização para o preparo das farinhas (Costa, 1999).

Para determinação das atividades enzimáticas, os extratos totais das folhas primárias e secundárias e do sistema radicular foram obtidos através de maceração em graal, com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 1,0 M, na proporção de 1:3 (p/v), sob banho de gelo. Após maceração, realizada por cerca de 20 minutos, a suspensão foi filtrada e centrifugada (10.000 x g por 20 minutos). O teor de proteína foi avaliado pela técnica descrita por Bradford (1976), a atividade peroxidásica através da metodologia descrita por Urbanek *et al.*, (1991), sendo o guaiacol utilizado como substrato doador de prótons e peróxido de hidrogênio como receptor e a absorbância medida a 480 nm. Para determinação da atividade β -1,3-glucanásica foi determinada a velocidade de produção de glucose usando-se laminarina como substrato e glucose como padrão, de acordo com o método de Somogyi (1952).

Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra a presença de atividade peroxidásica nas raízes tanto do genótipo CE-31 como no CE-109. Entretanto, os níveis basais do genótipo resistente à meloidoginose (CE-31) são maiores do que do genótipo suscetível. Ademais, quando se trata do cultivar resistente, há um aumento significativo da atividade peroxidásica em resposta à evolução da infecção, sugerindo a participação destas enzimas no mecanismo de defesa da planta.

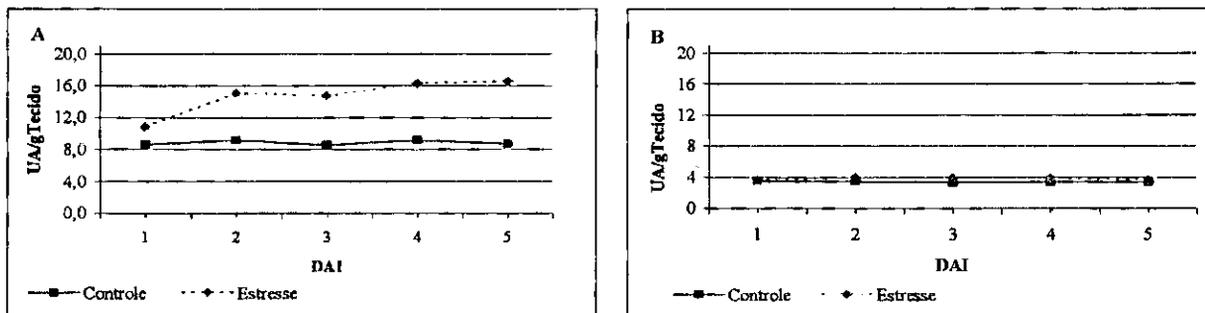


FIGURA 1. Atividade peroxidásica em raízes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., genótipo CE-31 (A) e genótipo CE-109 (B) submetidos ao estresse biótico por *Meloidogyne incognita*. DAI (dias após inoculação).

Em relação à infecção pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*, análises da atividade peroxidásica mostram um aumento após 18 e 24 horas de inoculação nas folhas primárias da cultivar BR3 (Figura 1A) e um aumento após 18 horas de inoculação na cultivar TE-97 (Figura 1B), em comparação com os controles, sugerindo uma resposta positiva destas plantas ao ataque do fungo. Nas folhas secundárias não foi observada diferença de atividade peroxidásica nos genótipos estudados (Figura C e Figura D), sugerindo que não ocorreu uma resposta sistêmica adquirida (SAR). Em relação à atividade β -1,3 glucanásica, não foi observada diferença entre plantas tratadas e controles de ambos os genótipos (dados não apresentados).

Em relação à resposta ao estresse hídrico, foi observado que logo após o início do estresse a enzima β -1,3-glucanase (Figura 3A) respondeu com aumento da atividade, alcançando um platô que perdurou mesmo após 2 dias da rehidratação e indo se igualar à atividade dos controles em seguida. Houve, também, aumento da atividade

peroxidásica até o quarto dia após o início do estresse, decrescendo logo que houve rehidratação (Figura 3B). Respostas positivas destas enzimas ao tratamento de plantas com eliciadores abióticos tais como ácido salicílico (Fernandes, 1998), fertilização do solo, diferença de temperatura, luz UV-B (Leubner-Metzger e Meins, Jr, 1999) perturbações mecânicas (Cipollini, Jr, 1998) já foram relatadas. Em todos estes casos, acredita-se que as plantas utilizam-se destas enzimas para preservar sua homeostase fisiológica através de mecanismos até hoje não entendidos.

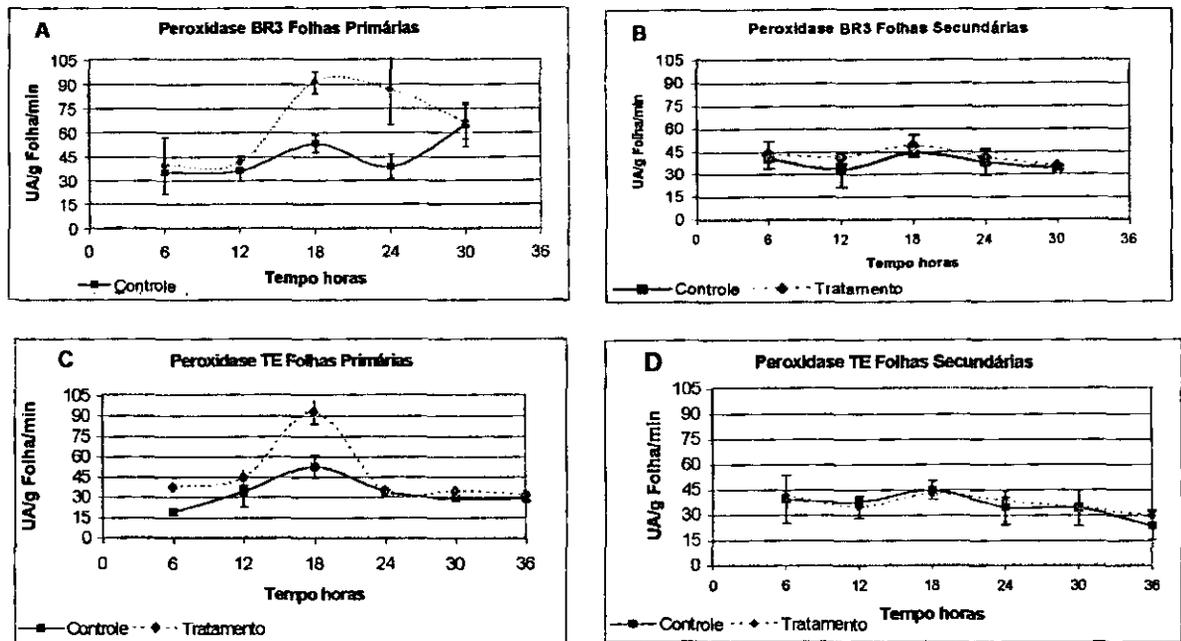


FIGURA 2. Atividade peroxidásica em folhas primárias e secundárias de *Vigna unguiculata*, cv. BR3-Tracueteua (B, C) e TE 97 (A, D) controles e infectadas com *C. gloesporioides*.

Como conclusão, o aumento dos níveis de peroxidase no genótipo resistente à meloidoginose sugere que o processo de lignificação deve ser induzido no genótipo resistente. Entretanto, em se tratando dos genótipos inoculados com o fungo, os resultados demonstram que ocorreu um aumento da atividade peroxidásica nas folhas primárias após inoculação do fungo de ambas cultivares BR3 e TE 97, mas em tempos distintos, o que pode caracterizar uma resposta de um genótipo resistente à antracnose. No caso do estresse hídrico, as duas enzimas estudadas apresentaram aumento de atividade. Entretanto, estudos adicionais são necessários para se entender o porquê destas alterações. Comparando os dados deste trabalho com os da literatura, onde há relatos do aumento da expressão de genes correspondentes a estas enzimas em resposta às várias situações de estresse, tanto bióticos como abiótico, chega-se a conclusão de que tais respostas, embora importantes para a fisiologia da planta, ocorrem de maneira inespecífica.

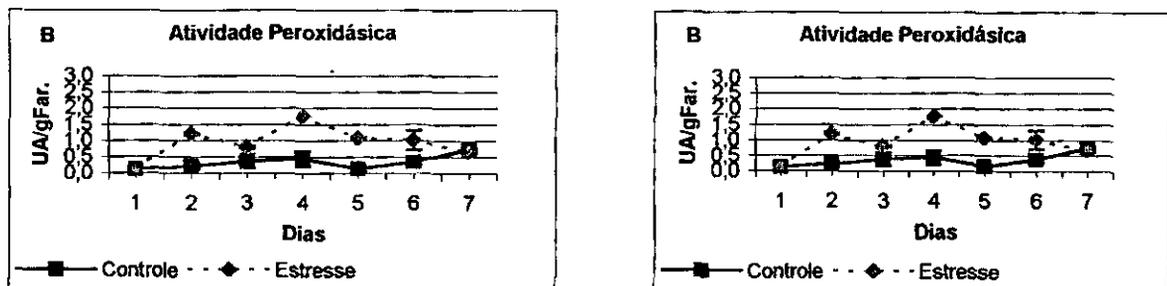


FIGURA 3. Atividade β-1,3-glucanásica (A) e peroxidásica (B) em folhas de feijão-de-corda submetidas ao estresse hídrico.

Suporte Financeiro: CNPq, CAPES, FUNCAP, PRONEX.

Referências

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRUCE, R.J. ; WEST, C.A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectics fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiology*, v.91, p.889-987, 1989.
- CIPOLLINI, D.F. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *American Journal of Botany*, v. 85, n.11, p.1586-1591, 1998.
- COSTA, R.C.L. **Assimilação de nitrogênio e ajustamento osmótico em plantas noduladas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. submetidas ao estresse hídrico.** Fortaleza: UFC, 1999. 225p. Tese de Doutorado em Bioquímica.
- FERNANDES, C.F. **Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] vv. Vita 3.** Fortaleza: UFC, 1998. 65p. Dissertação de Mestrado em Bioquímica.
- GIANINAZZI, S.; MARTIN, C.; VALLÉE, J.C. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *CR Academy of Science of Paris*, v.270, série D, p.2383-2386, 1970.
- GOMES, V.M.; OLIVEIRA, A.E.A.; XAVIER-FILHO, J.A. A chitinase and β -1,3-glucanase isolated from the seeds of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] inhibit the growth of fungi and insect pests of the seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.72, p.86-90, 1996.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station*, University of California, Berkeley, Circ. 347, 139.
- LEUBNER-METZGER, G.; MEINS, F. Functions and regulation of plant β -1,3-Glucanases (PR-2). In: DATTA, S.K. ; MUTHUKRISHNANS, S. (Ed.) **Pathogenesis-related proteins in plants.** Boca Raton: CRC Press., 1999. cap.3, p.49-76.
- PONTE, J.J. Nematóides do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P. de; WATT, E.E. (Ed.). **O caupi no Brasil.** Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. cap.20, p.591-601.
- RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P. de; WATT, E.E. (Ed.). **O caupi no Brasil.** Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p.547-589.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, v.195, p.19-23, 1952.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.).** Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978.
- URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.13, p.43-50, 1991.
- XUE, L.; CHAREST, P.M.; JABAJI-HARE, S.H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, v.88, p.359-365, 1998.