

**Determinação da atividade peroxidásica em
cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*)
tratados com ácido salicílico**



ISSN 1677-8618
Outubro, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 41

Determinação da atividade peroxidásica em cultivares de feijão- caupi (*Vigna unguiculata*) tratados com ácido salicílico

Cléberon de Freitas Fernandes
Vadjah Cristinne P. Moraes
José Tadeu A. Oliveira

Porto Velho, RO
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia

BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO

Telefones: (69) 3901-2510, 3225-9387, Fax: (69) 3222-0409

www.cpafrro.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Flávio de França Souza*

Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros:

Abadio Hermes Vieira

André Rostand Ramalho

Luciana Gatto Brito

Michelliny de Matos Bentes Gama

Vânia Beatriz Vasconcelos de Oliveira

Normalização: *Alexandre César Silva Marinho*

Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*

Revisão gramatical: *Wilma Inês de França Araújo*

1ª edição

1ª impressão (2006): 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

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

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Rondônia.

Fernandes, Cléberon de F.

Determinação da atividade peroxidásica em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tratados com ácido salicílico. / Cléberon de F. Fernandes, Vadjah Cristina P. Moraes, José Tadeu A. Oliveira. – Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006.

11 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia, ISSN 1677-8618; 41).

1. Feijão-caupi. 2. Atividade peroxidásica. 3. Ácido salicílico. I. Moraes, Vadjah Cristinne P. II. Oliveira, José Tadeu A. III. Título. IV. Série.

CDD 635.6592

© Embrapa – 2006

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e métodos	7
Resultados e discussão	8
Conclusões	10
Referências	10

Determinação da atividade peroxidásica em cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tratados com ácido salicílico

*Cléberon de F. Fernandes*¹
*Vadjah Cristinne P. Moraes*²
*José Tadeu A. Oliveira*³

Resumo

Apesar de sua aparente passividade, as plantas reagem quando submetidas a situações adversas, tais como, o ataque de fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos e também sob estresse abiótico, como por exemplo, variações de temperatura, ausência de água ou tratamento com agentes químicos. Dentre o arsenal de defesa utilizado pelas plantas estão o reforço da parede celular (lignificação) e a indução de PR-Proteínas. A peroxidase (POX) é uma enzima associada com este processo, sendo, portanto, associada ao mecanismo de resposta de defesa. No presente trabalho avaliou-se a POX em duas cultivares de feijão-caupi ('Mulato' e 'Gurguéia'), visando a promover um maior entendimento do mecanismo de defesa desta importante cultura, procurando verificar a participação desta enzima neste processo. Folhas primárias das duas cultivares foram tratadas com ácido salicílico 10 mM no 10º dia após o plantio. As folhas foram coletadas com 1, 2, 3, 4, 6 e 9 dias após o tratamento, sendo o extrato total utilizado na determinação de proteínas e atividade POX. O teor de proteínas nas cultivares testadas não mostrou diferença significativa após o tratamento. A atividade POX foi induzida após o tratamento em ambas as cultivares, com pico de atividade 9 dias após o tratamento. A cultivar 'Gurguéia' (109,65 UA/gF) apresentou maior nível de atividade POX quando comparada com a cultivar 'Mulato' (88,00 UA/gF). Estes resultados sugerem a participação da POX no mecanismo de defesa do feijão-caupi.

¹ Farmacêutico, D.Sc., Embrapa Rondônia, Caixa Postal 406, CEP 78900-970, Porto Velho, RO. E-mail: cleberon@cpafrro.embrapa.br.

² Graduanda em Biologia, Universidade Federal do Ceará, Caixa Postal 6020, CEP 60451-970, Fortaleza, CE. E-mail: vadjah@pop.com.br.

³ Biólogo, D.Sc., Universidade Federal do Ceará. E-mail: jtaolive@ufc.br.

Peroxidase activity evaluation in cowpea genotypes (*Vigna unguiculata*) challenged with salicylic acid

Abstract

Despite their apparent passivity, plants react when submitted to adverse situations, such as the attack of fungi, bacteria, virus and nematodes, and also under abiotic stress, as for example, temperature variation, drought and treatment with chemical agents. Among the defense arsenal used by the plants, there are the cell wall reinforcement (lignification) and the so called PR - Proteins (pathogenesis related proteins). Peroxidase (POX) is an enzyme that has been frequently associated to the plant response mechanisms. In this work we evaluated POX activity in two cowpea genotypes ('Mulato' and 'Gurguéia'), with the aim of studying cowpea defense mechanism, trying to verify the participation of POX in this process. Fully expanded primary leaves of 10-day-old cowpea genotypes were sprayed with 10 mM salicylic acid. Primary leaves were collected 1, 2, 3, 4, 6 and 9 days after treatment and crude extracts obtained from primary leaves were used for determination of enzyme activity and protein concentration. Protein content in both cowpea genotypes not showed significant difference after the treatment. POX activity was induced after the treatment in both cowpea genotypes, with higher activity 9 days after the treatment. 'Gurguéia' genotype showed higher POX activity (109.65 UA/gLeaves) when compared with 'Mulato' (88.00 UA/gLeaves). These findings suggest that POX might play an important role in the cowpea defense mechanism.

Index terms: Defense response, Cowpea, Peroxidase, Salicylic acid.

Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], ou feijão-de-corda, é um importante produto no mercado brasileiro, principalmente nas Regiões Norte e Nordeste, ocupando juntamente com o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), em torno de 12% da área total cultivada no país (CUNHA, 1997). O Ceará é o maior produtor nacional, sendo responsável por cerca de 20% da produção total de *Vigna* (BARRETO, 1999). Embora bem aclimatado a essas regiões, existem vários fatores que prejudicam a produção de feijão. Dentre eles, estão os estresses sofridos pela cultura, que podem ser de natureza biótica (vírus, bactérias, fungos, nematóides) ou abiótica (temperatura, salinidade, água) (SOBRINHO *et al.*, 2000).

Em resposta a esses estresses (bióticos e/ou abióticos), a planta utiliza seu sistema de defesa, que envolve alguns mecanismos, dentre os quais destacam-se a Resposta Hipersensitiva (HR) e a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR). Esses processos levam ao acúmulo das Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-Proteínas), como por exemplo, as enzimas glucanases, quitinases e peroxidases (VAN LOON, 1999; Fernandes, 1998).

As peroxidases são uma classe de proteínas que possuem sua atividade aumentada na presença de situações de estresse (biótico ou abiótico). Ela está envolvida no processo de lignificação da parede celular, catalisando o último passo enzimático da biossíntese da lignina (HIGUCHI, 1985). Nesse trabalho, dois genótipos de feijão-caupi, 'Mulato' e 'Gurguéia', foram submetidos a um estresse abiótico por Ácido Salicílico 10 mM e a atividade peroxidásica medida em diferentes tempos, com o objetivo de verificar a participação desta enzima no mecanismo de defesa do feijão-caupi.

Material e métodos

- ✓ **Germinação das sementes e tratamento das plântulas:** Sementes de duas cultivares de feijão-caupi, 'Mulato' e 'Gurguéia', foram desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio 1%, lavadas e embebidas por 20 minutos em água destilada. As sementes foram colocadas para germinar em areia lavada e autoclavada, e cultivadas em casa de vegetação. O plantio foi irrigado com água destilada até o sétimo dia de plantio, sendo, a partir daí, irrigado a cada dois dias com solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950), diluída 1:10, intercalada com água destilada. No décimo dia, as plantas foram transferidas para câmara de crescimento e as folhas primárias foram pinceladas com ácido salicílico 10mM (FERNANDES, 1998). As folhas primárias das cultivares foram coletadas com: 1, 2, 3, 4, 6 e 9 dias após o tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial tipo 2 x 6 x 2 (tratamentos x tempo x cultivares), com 3 repetições. A comparação entre as médias foi feita através do desvio padrão da média ao longo do tempo. Cada média foi resultado de determinações em triplicata para cada um dos parâmetros estudados.

- ✓ **Preparação do extrato total:** Folhas primárias foram maceradas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, na proporção 1: 5 (p/v) em gral (5 minutos, 4 °C). Após a maceração, o extrato foi filtrado em pano de nylon e centrifugado (10.000 x g, 4 °C, 20 minutos). O sobrenadante foi coletado e usado para determinação de proteínas e da atividade peroxidásica.
- ✓ **Determinação de proteínas:** A determinação de proteínas foi feita seguindo o método descrito por Bradford (1976). À alíquotas de 100 µL dos extratos totais foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. Leituras de absorbância a 595 nm foram feitas após 10

minutos. Usando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), o teor de proteínas nos extratos foi calculado.

- ✓ **Determinação da atividade peroxidásica:** A atividade peroxidásica foi calculada seguindo a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991). A mistura reacional foi composta de 0,990 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, 0,5 mL de guaiacol 0,02 M, 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,06M e 0,010 mL do extrato total. A mistura reacional foi incubada a 30 °C, por 10 minutos e, em seguida, teve sua absorbância a 480 nm medida. A variação de 1,0 unidade de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1,0 unidade de atividade peroxidásica.

Resultados e discussão

A análise macroscópica das folhas primárias dos dois genótipos de feijão-caupi, 'Gurguéia' e 'Mulato', mostrou, após o tratamento com ácido salicílico 10 mM, a presença de lesões esbranquiçadas, sugestivas de resposta hipersensitiva (morte celular) no sítio de aplicação da solução. A análise do teor de proteínas do genótipo 'Gurguéia' mostrou um discreto aumento entre as plantas controle e as tratadas (Fig. 1). O teor de proteínas não mostrou diferença significativa para a cultivar 'Mulato' (Fig. 2).

Aplicação exógena de ácido salicílico nas mais diferentes espécies de plantas induziu a expressão de genes de PR-Proteínas, não apenas no local de aplicação, mas também de forma sistêmica, sugerindo que o ácido salicílico atue como sinalizador na resistência sistêmica adquirida (SAR), que é uma forma de resistência induzida que aumenta a resistência de plantas contra subseqüentes infecções e ataques de fitopatógenos (KESSMANN *et al.*, 1994; AUDENAERT *et al.*, 2002).

O tratamento com ácido salicílico 10 mM foi capaz de induzir um aumento na atividade peroxidásica em ambos os genótipos, tendo pico de atividade com 9 dias após o tratamento. A cultivar 'Gurguéia' (109,65 UA/gF) apresentou maior nível de atividade POX quando comparada com a cultivar 'Mulato' (88,00 UA/gF) (Figuras 3 e 4).

Indução da atividade POX tem sido observada sob as mais diferentes condições de estresses, quer sejam eles de origem abiótica, tais como, salinidade, ácido 2,6-dicloroisonicotínico, ácido abscísico ou ácido salicílico (SREENIVASULU *et al.*, 1999; LIN e KAO, 2001; MARTINS-MIRANDA, 2002; FERNANDES *et al.*, 2006) ou biótica, tais como, plântulas de arroz inoculadas com *Xanthomonas oryzae*, onde a acumulação de POX foi observada em células do parênquima do xilema (HILAIRE *et al.*, 2001).

A participação da enzima POX no mecanismo de defesa das plantas é atribuído à capacidade desta enzima em participar do processo de lignificação da parede celular da planta, o que levaria a uma maior resistência desta ao ataque de patógenos. Resultados semelhantes foram observados em feijão-caupi, cv. 'Vita 3', tratado com ácido salicílico (FERNANDES *et al.*, 2006). Neste caso, uma isoforma aniônica foi notadamente induzida após o tratamento com o ácido salicílico, sugerindo, assim, a participação desta no mecanismo de defesa da planta.

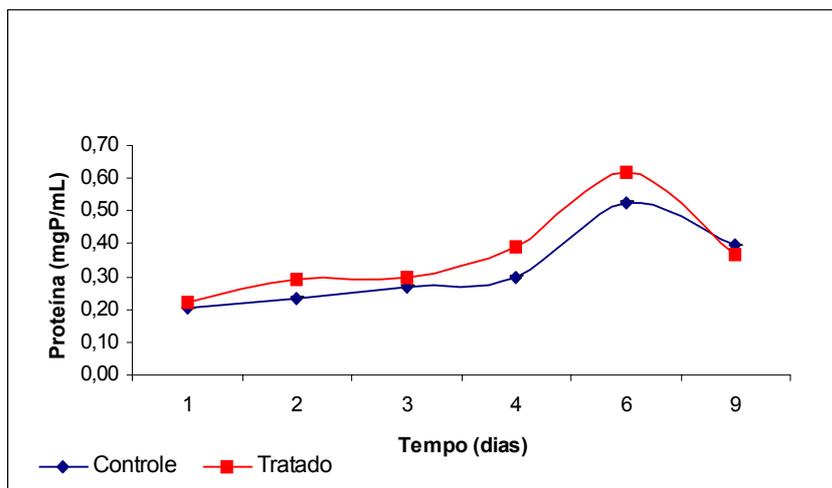


Fig. 1 - Determinação do teor de proteínas em folhas primárias de feijão-caupi cv. 'Gurguéia' tratada com ácido salicílico 10 mM.

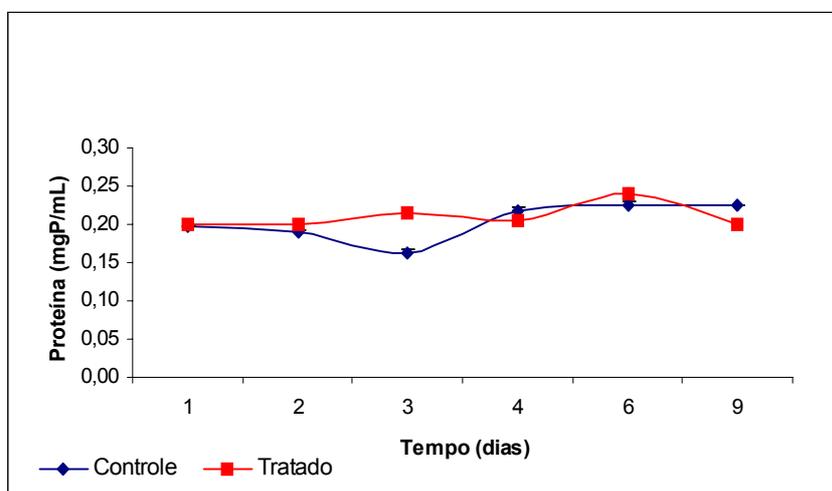


Fig. 2. Determinação do teor de proteínas em folhas primárias de feijão-caupi cv. 'Mulato' tratada com ácido salicílico 10 mM.

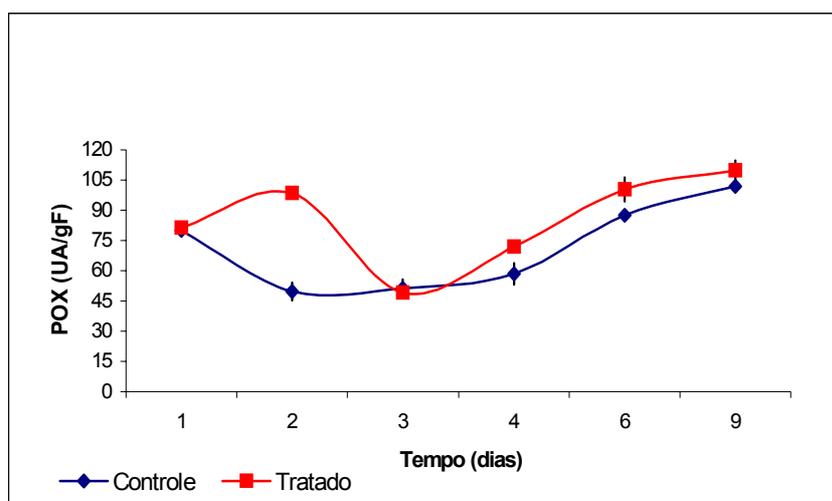


Fig. 3. Determinação da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-caupi cv. 'Gurguéia' tratada com ácido salicílico 10 mM.

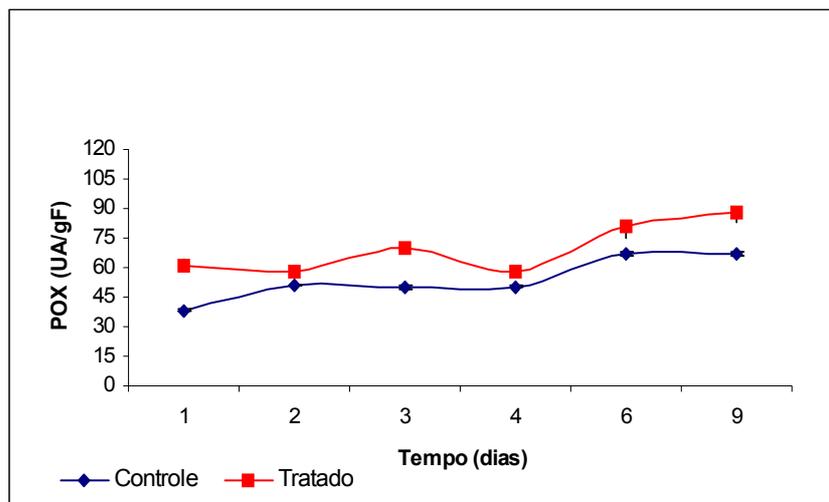


Fig. 4. Determinação da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-caupi cv. 'Mulato' tratada com ácido salicílico 10 mM.

Conclusões

As duas cultivares de feijão-caupi mostraram diferenças na resposta de defesa quando submetidas à situação de estresse abiótico. A indução da atividade peroxidásica é indicativo da participação desta enzima no mecanismo de defesa do feijão-caupi, podendo indicar um papel importante da mesma no arsenal de defesa da planta. Estudos subseqüentes visando elucidar o mecanismo pelo qual esta enzima participa deste processo são agora necessários.

Referências

AUDENAERT, K.; PATTERY, T.; CORNELIS, P.; HÖFTE, M. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 11, p. 1147-1156, 2002.

BARRETO, P. D. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: avanços e perspectivas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Disponível em <http://www.cpatsa.embrapa.br>. Acesso em 01 nov. 1999.

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

CUNHA, C. O. **Cultura do feijoeiro**: microbiologia, biologia molecular e taxonomia das bactérias. 1997. 117 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Agronomia, Lueven, Bélgica.

FERNANDES, C. F. **Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] CV. Vita 3**. 1998. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

HIGUCHI, T. Biosynthesis of lignin. In: HIGUCHI, T. (Ed.). **Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components**. New York: Academic Press, 1985, p. 141-160.

HILAIRE, E.; YOUNG, S. A.; WILLARD, L. H.; MCGEE, J. D.; SWEAT, T.; CHITTOOR, J. M.; GUIKEMA, J. A.; LEACH, J. E. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 12, p. 1411-1419, 2001.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of University of California, Berkeley**, v. 347, p. 139, 1950.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994.

LIN, C. C.; KAO, C. H. Abscisic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. **Plant Science**, v. 160, p. 323-329, 2001.

MARTINS-MIRANDA, A. S. **Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] expostas à salinidade e deficiência hídrica**. 2002. 85 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOBRINHO, C. A.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. dos. Doenças do feijão feijão-de-corda. In: Cardoso, M. J. (Org). **A cultura do feijão-de-corda no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. p. 155-183. Cap. VIII.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRA-KINI, K.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H. S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, v. 141, p. 1-9, 1999.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 1991.

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

Embrapa

Rondônia

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO