

## BENZOTIADIAZOL (BTH) INDUZ ATIVIDADES DAS ENZIMAS PEROXIDASE, $\beta$ -1,3-GLUCANASE E FORMAÇÃO DE LIGNINA EM FEIJÃO-CAUPI

A. S. MARTINS-MIRANDA<sup>1</sup>, J. E. MONTEIRO JÚNIOR<sup>1</sup>, D. M. F. GONDIM<sup>1</sup>, A. L. H. BARRETO<sup>3</sup>, F. R. FREIRE-FILHO<sup>3</sup>, I. M. VASCONCELOS<sup>1</sup> e J. T. A. OLIVEIRA<sup>1</sup>

**Resumo** – O feijão-caupi se constitui numa importante fonte de proteínas, carboidratos e vitaminas sendo cultivado em vários países em desenvolvimento. Entretanto, herbívoros e fitopatógenos são responsáveis por grandes perdas nesta cultura. Para diminuir estes problemas, estratégias envolvendo o uso de elicitores químicos da resposta de defesa vegetal têm sido desenvolvidas. Dentre esses elicitores há aqueles que induzem resposta sistêmica adquirida (SAR) como o BTH [(1,2,3)-Benzothiadiazole-7-carbotioico S-metil ester]. Este trabalho teve como objetivo avaliar se o BTH é capaz de induzir a expressão de proteínas relacionadas à patogênese como peroxidase (POX),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU), fenilalanina amônia-liase (PAL) e o aumento do conteúdo de lignina em folhas de feijão-caupi, cv. TE-97-411. Dez dias após plantio, a parte aérea das plantas foi borrifada com diferentes concentrações de BTH. Para determinação das atividades enzimáticas, foram utilizadas folhas coletadas com 48 horas, e, para lignina, com 10 e 15 dias após tratamento. Aumento nas atividades destas enzimas, com exceção da PAL, e na deposição de lignina foi observado nas plantas tratadas. Estes resultados sugerem que o BTH representa uma estratégia potencial para ativação da defesa bioquímica do feijão-caupi.

**Palavras-chave:** benzotiadiazol (BTH), resistência induzida, defesa vegetal,

## BENZOTHIADIAZOLE (BTH) INDUCES PEROXIDASE, $\beta$ -1,3-GLUCANASE ACTIVITIES AND LIGNIN FORMATION IN COWPEA

**Abstract** - Cowpea is an important leguminous plant cultivated in several developing countries of the world. It constitutes important source of proteins, carbohydrates and vitamins. Unfortunately, herbivores and pathogenic microorganisms are responsible for great losses in this crop. Several strategies have been developed to overcome these problems, including the induction of plant defense responses. Induced resistance may provide an alternative approach to plant protection and it can be activated in plants by chemical inducers such as Benzo-

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará/ Caixa Postal 6033, CEP 60451-970, Fortaleza, CE. E-mail: jtaolive@ufc.br

<sup>2</sup>Embrapa Meio-Norte/ Caixa Postal 01, CEP 64006-220, Teresina, PI. E-mail: alhortab@yahoo.com.br

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

(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid s-methyl ester (BTH). The aim of this present work was to evaluate if BTH is able of inducing the pathogenesis related proteins, peroxidase (POX),  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU), phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and the lignin content in cowpea leaves, cv. TE-97-411. Ten day-old plants had their shoots sprayed with BTH in different concentrations. Enzymatic activities were carried out in leaves collected 48 hours after spraying whereas the lignin content was evaluated at 10 and 15 days after treatment. Except for PAL, significant increase in POX, GLU activities and lignin deposition were observed in BTH-treated plants. These results suggest that BTH treatment represents a potential strategy to induce the biochemical defense of cowpea.

**Keywords:** benzothiadiazole (BTH), induced resistance, vegetal defense.

### Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das mais antigas culturas conhecidas pelo homem. Seu cultivo mundial abrange cerca de 20 milhões de acres (1 acre = 4.047 m<sup>2</sup>) (Quinn & Myers, 2002), com produção superior aos 2 milhões de toneladas. Possui alto conteúdo protéico, é rico em minerais e vitaminas (Van Le et al., 2002) e apresenta boa capacidade de fixação de nitrogênio, sendo ainda pouco exigente em fertilidade e adaptado a altas temperaturas (Valenzuela & Smith, 2002).

Apesar destas características, o feijão-caupi e as plantas, de um modo geral, são continuamente atacados por patógenos e pragas (Sobrinho et al., 2000). Uma resposta comum a estes vegetais é a resistência sistêmica adquirida (SAR) um mecanismo de defesa induzido que tem papel central na resistência de plantas a patógenos (Anfoka, 2000). A SAR se caracteriza pelo acúmulo de mRNAs que codificam para um conjunto de genes SAR (Ward et al., 1991). Dentre os diversos produtos gênicos desta resposta estão as PR-proteínas (proteínas relacionadas a patogêneses) (Sparla et al. 2003).

As famílias das PR-proteínas incluem enzimas que atuam em processos que se estendem desde a lignificação da parede celular de plantas, em resposta ao ataque de patógenos, como as peroxidases (Cipollini Junior, 1998), até a modificação da parede celular de microorganismos patogênicos, como as  $\beta$ -1,3-glucanases (Mee Do et al., 2004).

Além das PR-proteínas, enzimas como a fenilalanina amônia liase (PAL E.C. 4.3.1.5) também estão envolvidas na resposta sistêmica adquirida. A PAL é responsável pela conversão do aminoácido fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, um intermediário chave na via bioquímica que leva à produção de lignina e ácido salicílico (AS), dentre outros compostos secundários de defesa como as fitoalexinas.

A lignificação é um processo de defesa que se caracteriza pelo espessamento e enrijecimento da parede celular dificultando a entrada do patógeno. Este processo está freqüentemente limitado às células localizadas no sítio de infecção. Aumento na lignificação tem sido observado em plantas resistentes e isso faz com que esse processo assuma papel crucial na defesa vegetal (Stadnik & Buchenauer, 2000).

Na tentativa de potencializar as defesas naturais das plantas, uma alternativa promissora no controle de várias doenças é o uso de compostos capazes de induzir a SAR, como o ácido (1,2,3)-Benzotiadiazole-7-carbotioico S-metil ester (BTH ou Bion<sup>®</sup>). O BTH é um produto químico conhecido por induzir a SAR (Sparla et al. 2003). Apresenta baixa toxicidade para plantas e animais e alta eficiência na proteção de numerosas espécies de plantas contra uma variedade de patógenos (Iriti & Faoro, 2003). O estudo do processo de indução e amplificação da resposta de defesa em plantas pelo BTH é de grande importância visto que o emprego deste composto pode representar uma importante estratégia para aumentar a resistência do feijão-caupi.

### **Materiais e Métodos**

Condições de crescimento vegetal: Sementes de feijão-caupi, cultivar TE97-411, foram colocadas para germinar em potes plásticos, sendo utilizado como substrato areia estéril.

Tratamento e coleta das plantas: O BTH (BION<sup>®</sup>), da Syngenta, foi dissolvido em água Milli-Q nas proporções de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM de ingrediente ativo (acibenzolar-S-metil CGA 245704). A indução foi feita através da pulverização da parte aérea das plantas no décimo dia após plantio. 48 horas após tratamento, as folhas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a - 85 °C.

Extratos totais e dosagem de proteínas solúveis: Os extratos totais foram obtidos através de maceração das folhas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl  $5 \times 10^2$  mM, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM na proporção de 1:3 (m/v). Após maceração, a suspensão foi filtrada e centrifugada a  $15.000 \times g$ , 4 °C, 20 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para determinação de atividades enzimáticas e dosagem de proteínas solúveis (Bradford, 1976).

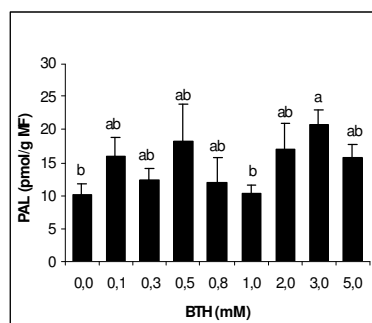
Atividades enzimáticas: Para a determinação da atividade peroxidásica (POX) foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek et al., (1991); para  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) a descrita por Boller (1993); e para atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) a descrita por Mori et al. (2001).

Determinação de lignina: Folhas de plantas cultivadas e tratadas conforme descrito nos itens anteriores foram coletadas 10 e 15 dias após tratamento. Foi utilizada solução de ácido

tricloroacético em etanol e clorofórmio para remoção dos pigmentos. Em seguida, estas folhas foram coradas conforme descrito por Stange & McDonald, (1999) com modificações para tecido foliar.

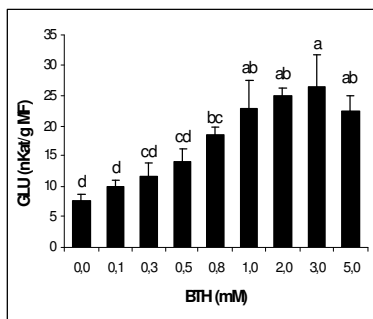
## Resultados e Discussão

Em folhas de feijão-caupi tratadas com BHT não foi observado aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) quando comparado ao controle (Figura 1). Resposta de aumento da PAL, frente a tratamentos com este indutor foi relatada em feijão-caupi inoculado com *Colletotrichum destructivum* (Latunde-Dada & Lucas, 2001). Stadnik & Buchenauer (2000) observaram que a inibição da PAL diminuiu a resistência promovida pelo BHT em trigo inoculado com o fungo *Blumeria graminis* f. sp. Triticici.

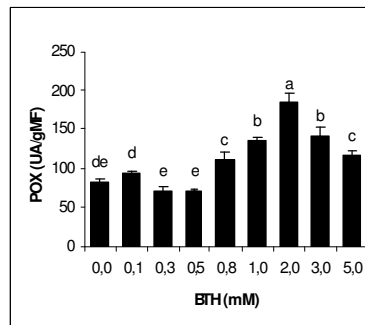


**Figura 1** – Atividade de PAL em feijão-caupi, cv. TE 97-411, tratado com diferentes concentrações de BTH.

O tratamento com BHT induziu aumento na atividade de POX quando comparada com os controles (Figura 2), mas nas concentrações acima de 0,8 mM, com pico máximo de atividade em 2,0 mM. Malolepza (2005) e Stadnik & Buchenauer (2000) também observaram atividade de POX em plantas tratadas com BHT. Em tecidos foliares, foi observado aumento, dosedependente, na atividade  $\beta$ -1-3-Glucanásica (Figura 3). O aumento destas enzimas também foi observado em batata tratadas com BHT (Brookshi et al., 2003).

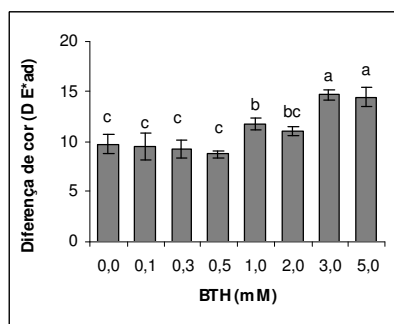


**Figura 2.** Atividade de POX em feijão-caupi, cv. TE 97-411, tratado com diferentes concentrações de

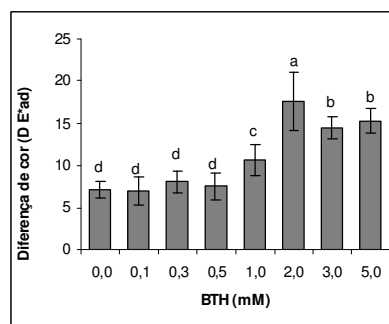


**Figura 3.** Atividade de GLU em feijão-caupi, cv. TE 97-411, tratado com diferentes concentrações de BTH.

BHT foi também capaz de induzir lignificação em folhas secundárias de plantas de feijão-caupi tratadas nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM (Figuras 4 e 5), sendo estes resultados semelhantes para os tempos de 10 e 15 dias após o tratamento. Entretanto, em folhas primárias, não foram observadas diferenças na lignificação do tecido nas diferentes concentrações utilizadas (dados não mostrados). Em folhas secundárias, além do aumento da intensidade da coloração (medida em colorímetro Minoalta como meter CR-200), indicativo de aumento do teor de lignina no tecido, foi evidenciada redução na expansão foliar, provavelmente, resultante do contingenciamento celular imposto pelo aumento da lignificação induzida pelo tratamento com BHT.



**Figura 4.** Concentração de lignina em folhas secundárias de feijão-caupi, cv. TE 97-411, 10 dias após tratamento com BTH.



**Figura 5.** Concentração de lignina em folhas secundárias de feijão-caupi, cv. TE 97-411, 15 dias após tratamento com BTH.

## Conclusões

Dado que as enzimas POX, GLU e a deposição de lignina são importantes processos no mecanismo de defesa vegetal, o aumento promovido pelo BHT, sugere o uso deste composto

como uma alternativa promissora na indução de respostas de defesa em plantas de feijão-caupi.

### Agradecimentos

CNPq, CAPES, PRONEX, PROCAD, FUNCAP, PADCT.

### Referências

- ANFOKA, G. H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, v.19, p. 401-405, 2000.
- BOKSHI, A. I.; MORRIS, S. C.; DEVERALL, B. J. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on  $\beta$ -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**, v. 52, p. 22–27, 2003.
- BOLLER, T. Biochemical Analysis of Chitinases and  $\beta$ -1,3 -glucanases. in: GURR, S. J.; McPHERSON, M. J.; BOWLES, D. J (eds). **Molecular Plant Pathology**. New York: IRL Press, p. 23-29, 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CIPOLLINI JUNIOR, D. F. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 11, p. 1586-1591, 1998.
- IRITI M.; FAORO F. Benzothiadiazole (BTH) Induces Cell-Death Independent Resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 171–180, 2003.
- LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 58, p.199-208, 2001.
- MALOLEPSZA, U. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. **Crop Protection**, 2005. (Article in press).
- MEE DO, H.; CHUL LEE, S.; JUNG, H. W.; SOHN, K. H.; HWANG, B. K. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (*CADEF1*) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. **Plant Science**, v. 166, p. 1297-1305, 2004.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, v. 160, p. 355-360, 2001.

QUINN, J.; MYERS, R. **Cowpea**: A versatile legume for hot, dry conditions. Columbia: Jefferson institute, 2002. p. 1-4.

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

SOBRINHO, C. A.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças do feijão caupi. In: **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 263p.

SPARLA, F.; ROTINO L.; VALGIMIGLI, M. C.; PUPILLO, P.; TROST, P. Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*). **Scientia Horticulturae**, 2004. (Article in press).

STADNIK, M. J. BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. Triticum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 25-34, 2000.

STANGER, R. R.; Mc DONALD, R. E. A simple and rapid method for determination of lignin in plant tissues its usefulness in elicitor screening and comparison to the thioglycolic acid method. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15, p. 185-193, 1998.

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 LE, B., CARVALHO, M. H. C., ZUILY-FODIL, Y., PHAM THI, A. T., THANH VAN, K. T. (2002). Direct whole plant regeneration of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] from cotyledonary node thin cell layer explants. **Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 1-4, 2002.

WARD, E. R.; UKNES, S. J.; WILLIAMS, S. C.; DINCHER, S. S.; WIEDERHOLD, D. L.; ALEXANDER, D. C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J. P.; RYALS, J. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.