

DINÂMICA DE FENILALANINA AMONIA-LIASE E PEROXIDASE EM FEIJÃO-CAUPI TRATADO COM ACIBENZOLAR-S-METIL

C. ATHAYDE SOBRINHO¹, L. S. CAVALCANTI², K. R. BRUNELLI³ e J. O. M. MENTEN⁴

Resumo – O aumento na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e peroxidase tem sido associado a respostas inespecíficas de defesa vegetal. Objetivou-se com este trabalho verificar aumento na atividade dessas enzimas em plantas de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cv. Rouxinol, oriundas de sementes tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e desafiadas por *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta do caule. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 9 (tratamentos *versus* tempo de coleta) e três repetições. Os tratamentos foram representados pelo indutor (ASM), indutor + patógeno (ASM+MP), água + patógeno (H₂O+MP) e testemunha absoluta (H₂O). Os tempos de coleta foram: 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, após a semeadura e inoculação. Cada repetição foi representada por três sementes/plântulas. A atividade da FAL foi aumentada pela aplicação de ASM, especialmente nas 60 horas após a inoculação, sendo o mesmo verificado para peroxidase às 72 horas.

Palavras-chave: Fisiologia vegetal, tratamento de sementes.

PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE AND PEROXIDASES DYNAMIC IN COWPEA PLANTS TREATED WITH ACIBENZOLAR-S-METHYL

Abstract – Increase in the phenylalanine ammonia-lyase (FAL) and peroxidases activities has been associated with general plant defenses mechanism. This work aimed to verify increases in the activities of phenylalanine ammonia-lyase (FAL) and peroxidases enzymes in cowpea plants (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cv. Rouxinol, originated from treated seeds with acibenzolar-S-metil (ASM) and challenged by *Macrophomina phaseolina*, causal agent of charcoal root disease of cowpea. The experiment was set up in a randomized complete block design in split plot arrangement, with three replicates. Treatments were assigned as factor A and time as factor B. The treatments were represented by the acibenzolar-S-metil (ASM), ASM + pathogen (ASM + MP), water + pathogen (H₂O + MP) and control (water only). The samples were collected at zero, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 hours after sowing and inoculation. Each replicates was represented by three seeds/plantlets. The FAL activity was increased by the application of ASM, especially at 60 hours after inoculation. The same was observed for the peroxidase activity at 72 hours after inoculation.

Keywords: Plant physiology, seed treatment.

¹Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64006-220, Teresina, PI. E-mail: candido@cpamn.embrapa.br

²UNIVASF, Rodovia Juazeiro-Sobradinho, s/n, CEP 56314-520, Juazeiro, BA.
E-mail: leonardo.cavalcanti@univasf.edu.br

³SAKATA. E-mail: katia.brunelli@sakata.com.br

⁴ESALQ/USP, C.P. 09, CEP 13-417-900, Piracicaba, SP. E-mail: jomenten@esalq.usp.br

Introdução

O éster do ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbotióico (ASM) tem sido apontado como um dos mais promissores indutores de resistência vegetal (Görlach et al., 1996; Kunz et al., 1997), sendo o primeiro produto comercial de uma nova geração de protetores de plantas (Lyon & Newton, 1997). Jacobsen & Kiewnick (1998) observaram uma redução na severidade de mancha de *Cercospora* em plantas de beterraba após aplicação foliar de ASM. Em pimentão, o ASM mostrou-se eficiente para induzir resistência a diversas bactérias, como *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* e *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Venâncio et al., 2000). Mais exemplos podem ser verificados em outros trabalhos, como os realizados por Anfoka (2000), Cavalcanti (2000), Silva (2002) e Resende et al. (2002).

Em plantas de caupi inoculadas com *Colletotrichum destructivum*, o aumento da resistência em plântulas induzidas por ASM foi associado com um rápido e efetivo aumento na atividade de duas enzimas-chave na via dos fenilpropanóides (fenilalanina amônia-liase - FAL e chalcona isomerase - CHI), que levou a um acelerado acúmulo de substâncias do grupo dos flavonóides, kievitonas e faseolidina (Latunde-Dada & Lucas, 2001).

No patossistema cacau-*Verticilium dahliae*, Cavalcanti (2000) e Resende et al. (2002) observaram aumento na atividade da enzima peroxidase, destacando ser essa uma importante alteração fisiológica no processo de resistência induzida, em resposta à pulverização de plântulas de cacauzeiro com ASM.

O presente trabalho objetivou investigar a dinâmica das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e peroxidase em plantas de feijão-caupi oriundas de sementes tratadas com ASM e desafiadas por *M. phaseolina*.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Parasitismo e em casa de vegetação do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, em Piracicaba-SP.

As sementes de caupi, *V. unguiculata* cv. Rouxinol, foram obtidas na Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. A aplicação do produto comercial à base de benzotiadiazole (ASM), formulação grânulos dispersíveis a 50% (i.a.) foi realizada através da imersão das sementes em solução aquosa, ajustada a uma concentração de 25 ppm (i.a.) durante 24 horas. Em seguida, foram semeadas em vasos plásticos, com capacidade para cinco litros (12 sementes/vaso), nos quais foram colocados quatro litros de substrato esterilizado.

Empregou-se, como inóculo, o isolado de *M. phaseolina* MP103, obtido de sementes de feijão-caupi originárias do Estado do Piauí. O inóculo foi representado por cinco grãos de arroz "em casca" esterilizados e colonizados com o isolado fúngico. A inoculação foi realizada imediatamente após a semeadura e constou da deposição direta do inóculo sobre as sementes, conforme metodologia modificada de Abawi & Pastor-Corrales (1990).

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 9 (tratamentos *versus* tempo de coleta) e três repetições. Os tratamentos foram representados pelo indutor (ASM), indutor + patógeno (ASM + MP), água + patógeno (H₂O + MP) e testemunha absoluta (H₂O). Os tempos de coleta foram: zero, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, após a semeadura e inoculação. Cada repetição foi representada por três sementes/plântulas.

Imediatamente após a semeadura e inoculação, iniciou-se a coleta das amostras para determinação do teor de proteínas totais e análise da atividade das enzimas peroxidase e FAL. As plântulas e sementes sem tegumento foram trituradas em pistilo e almofariz, em 10 mL da solução

extratora (tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7, + 1 mg ditioneitol (DTT) /mL de tampão), resultando nas amostras diluídas que foram utilizadas em todas as determinações.

A atividade da peroxidase foi quantificada através da medida da absorbância a 470 nm da reação de oxidação do guaiacol (Cortelazzo et al., 1996). Para FAL utilizou-se a metodologia de Pascholati et al. (1986). O teor de proteínas totais das amostras foi quantificado conforme metodologia de Bradford (1976).

Resultados e Discussão

Observou-se menor nível de atividade da FAL nos tratamentos inoculados com *M. phaseolina* (ASM+MP e MP), entre os tempos de 0 e 24 horas (Figura 1). Resultados semelhantes foram destacados por Pascholati et al. (1986), para plantas de milho inoculadas com fungo incompatível. Por outro lado, altos níveis de atividade da enzima foram observados nos tratamentos com ASM às 60 horas após a inoculação. Esse padrão de alteração na atividade da FAL mostrou-se semelhante ao observado no patossistema feijão-caupi-*C. destructivum*, em que a atividade da enzima mostrou-se significativamente superior nas plantas induzidas com ASM, 18 h após a inoculação (Latunde-Dada & Lucas, 2001).

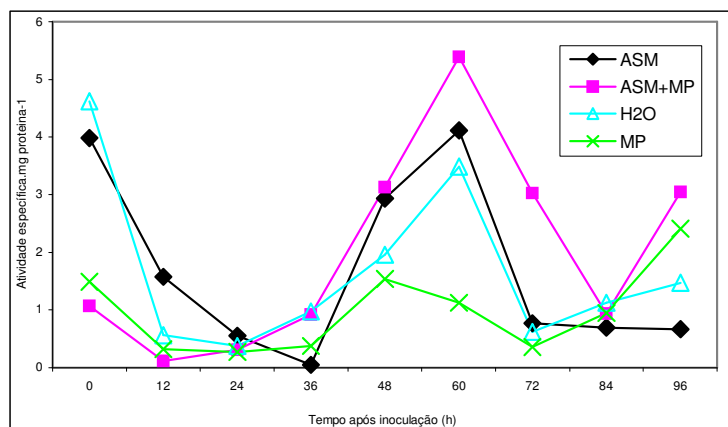


Figura 1. Atividade de FAL em sementes e plântulas de caupi cv. Rouxinol tratadas com ASM e desafiadas por *Macrophomina phaseolina*

Com relação à enzima peroxidase, observou-se que sua atividade foi aumentando gradualmente, intensificando-se a partir das 36 horas após inoculação de forma indistinta em todos os tratamentos. Entretanto, maior atividade foi observada a partir das 72 e 84 horas, para os tratamentos ASM + MP e ASM, respectivamente. (Figura 2). Esse rápido aumento se assemelha, conforme Floot et al. (1997), às respostas típicas de interações incompatíveis. Alterações na atividade da peroxidase têm sido observadas e descritas em plantas de tomate e algodão (Smit & Dubery, 1997), melão (Buzi et al., 2004), cacauzeiro (Cavalcanti, 2000; Resende et al., 2002), ervilha (Dann & Deverall, 2000), entre outros. No patossistema cacauzeiro-*Verticillium dahliae*, Resende et al. (2002) observaram aumento significativo na atividade da enzima, induzido pelo tratamento ASM isoladamente ou em associação com *V. dahliae*.

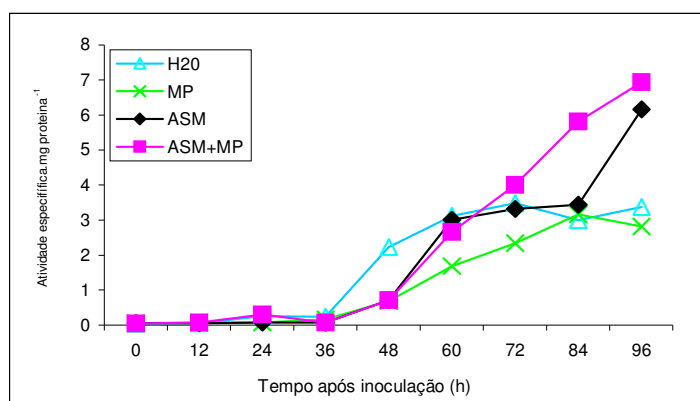


Figura 2. Atividade de peroxidase em sementes e plântulas de caupi cv. Rouxinol tratadas com ASM e desafiadas por *Macrophomina phaseolina*.

Analisando-se os efeitos resultantes da atividade biológica das enzimas FAL e peroxidase, diversos estudos têm destacado aumento da síntese de lignina nos tecidos vegetais (Buchanan et al., 2000; Oliveira et al., 2004), o que pode representar um aumento na capacidade de defesa de plantas contra patógenos.

Conclusões

O Acibenzolar-S-metil (ASM) usado como tratamento de semente afetou a dinâmica das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e peroxidase.

Maior atividade da FAL foi verificada às 60 horas após a inoculação.

Maior atividade da peroxidase foi verificada às 72 horas após a inoculação.

Referências

- ABAWI, G.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. **Root rots of bean in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies.** Bogotá: CIAT, 1990. 114p.
- ANFOKA, G. H. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill vc. Vollendung) to Cucumber Mosaic Virus. **Crop Protection**, v. 19, p. 401-405, 2000
- BRADFORD, K.J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **HortScience**, v. 21, p. 1105-1112, 1986.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants.** Rockville: ASPP, 2000. p. 1102-1156.
- BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytopathology**, v.152, p.34-42, 2004.
- CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM). 2000. 82f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

- CORTELAZZO, B.E.; MARAIS, M.F.; LOSELEAU, J.P. Changes in peroxidases in the suspension culture of *Rubus fruticosus* during growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p. 27-33, 1996.
- DANN, E.K.; DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, v. 49, p. 324-332, 2000.
- FLOOT, B.E.; MOERSCHBACHER, B.M.; REISNER, H.J. Peroxidase isoenzymes patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. **New Phytologist**, v. 111, p. 413-421, 1997.
- GÖRLACH, J.; VORATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENRY, G.; BECKHOVE, V.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; DESSMAN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v. 8, p. 629-643, 1996.
- Jacobsen & Kiewnick 1998
- KUNZ, H.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science**, v. 50, p. 275-282, 1997.
- 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.
- LYON, G. D.; NEWTON, A. C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, v. 46, p. 636-641, 1997.
- OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F.; GURGEL, L.M.S. Indução de resistência em doenças de pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 12, p.343-371, 2004.
- PASCHOLATI, S. F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v. 115, p. 165-172, 1986.
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C. G.; CARVALHO, G. A.; CASTRO, R. M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.5, p.621-628, 2002.
- SILVA, L.H.C.P. Resistência sistêmica ativada pelo acibenzolar-S-metil contra doenças em tomateiro. Lavras, 2002. 89p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.
- SMIT, F.; DUBERY, I.A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. **Phytochemistry**, v. 44, p. 811-815, 1997.
- VENÂNCIO, W.S.; ZAGONEL, J.; FURTADO, E.L.; SOUZA, N.L.; PERES, N.A.R. Novos fungicidas. II – Famaxadone e indutores de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 59-92, 2000.