

RESPOSTAS DE DEFESA DA PLANTA IMPEDEM O CRESCIMENTO DO FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides* NO GENÓTIPO DE FEIJÃO-CAUPI BR 3 TRACUATEUA

A. L. H. BARRETO¹, Y. R. G. ELOY², T. E. de MATOS², A. S. MARTINS-MIRANDA², F. C. O. FREIRE³,
F. R. FREIRE-FILHO¹, I. M. VASCONCELOS² e J. T. A. OLIVEIRA³

Resumo – O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das culturas mais importantes no semi-árido do Nordeste do Brasil. Embora tolerante às condições climáticas adversas, esta espécie é constantemente atacada por patógenos, ocasionando perdas na produção. Assim, o presente trabalho foi conduzido para avaliar que estratégias de infecção o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* utiliza para infectar e se desenvolver nos genótipos de feijão-caupi BR 3 Tracuateua e TE 97-411-1E e para verificar as respostas citológicas de defesa do feijão-caupi, como também o papel da fenilalanina amônia liase (PAL) no processo de infecção. Exame macroscópico mostrou um alto número de folhas primárias com lesões necróticas em TE 97-411-1E comparado com BR 3-Tracuateua. O processo de infecção foi iniciado indiretamente, via abertura dos estômatos, por tubos germinativos, sem formação de apressório. A atividade da PAL nas folhas de feijão-caupi aumentou em dois diferentes tempos após inoculação em ambos os genótipos. O primeiro pico pode estar associado a biossíntese inicial de compostos fenólicos e o segundo ao acúmulo posterior de compostos fenólicos e lignificação da parede celular do hospedeiro. O presente trabalho fornece evidências que a PAL tem um importante papel nas estratégias de defesa que o feijão-caupi emprega para se defender contra o fungo *C. gloeosporioides*. O crescimento do patógeno foi mais evidente no genótipo TE 97-411-1E, sugerindo que este é mais suscetível ao fungo do que BR 3-Tracuateua.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, fenilalanina amônia liase, respostas de defesa.

HOST DEFENSE RESPONSES RESTRICTS THE GROWTH OF THE FUNGUS *Colletotrichum gloeosporioides* IN COWPEA, BR 3 TRACUATEUA RESISTANT GENOTYPE

Abstract - Cowpea is one of the most important crops in the semiarid Northeast of Brazil. Although tolerant to adverse climate conditions it is constantly threatened by pathogens which impair production. Therefore, the present work was carried out in order to establish which infection strategies the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* uses to infect and develop in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], BR 3 Tracuateua and TE 97-411-1E genotypes, and to ascertain the associated cytological cowpea defense responses, as well as, the role of phenylalanine ammonia liase (PAL) in the infection process. Macroscopic examination showed a higher number of primary leaves with necrotic lesions on TE 97-411-1E compared to BR 3-Tracuateua. The infection process was initiated indirectly, via stomatal openings, by germ-tubes without appressorium formation. PAL activity in cowpea leaves increased at two different times

¹ Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí – Brasil.
E-mail: analucia@cpamn.embrapa.br

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, CE – Brasil.
E-mail: jtaolive@ufc.br

³ Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE – Brasil.

after inoculation in both genotypes. The 1st peak would be associated to the early biosynthesis of phenolic compounds and the 2nd one could be related to posterior accumulation of phenolic compounds and host cell wall lignification. This study provides evidence for the important role of PAL in the strategy employed by cowpea to defend the plant against *C. gloeosporioides*. The pathogen growth was more evidenced in the TE 97-411-1E genotype suggesting that this genotype is more susceptible to the fungus than BR 3-Tracueteua.

Keywords: *Vigna unguiculata*, phenylalanine ammonia liase, defense responses.

Introdução

O Feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa que apresenta alto valor econômico no Brasil, que é o terceiro maior produtor do mundo (Singh et al., 2002), sendo a produção predominante nas Regiões Norte e Nordeste. Mesmo bem adaptada, sob o ponto de vista climático, essa cultura enfrenta diversas dificuldades que afetam o volume da produção e a qualidade dos grãos produzidos, destacando-se as doenças causadas por agentes patogênicos (vírus, fungos, bactérias e nematóides). Espécies de *Colletotrichum* causam sintomas típicos de uma doença conhecida como antracnose, caracterizada por lesões necróticas profundas (Athayde Sobrinho et al., 2000). O tecido vegetal responde imediatamente à presença do fitopatógeno e o simples contato entre eles representa um fator importante para desencadear uma série de mecanismos de reconhecimento. As células vegetais diretamente afetadas pela invasão do patógeno sofrem mudanças morfológicas drásticas, freqüentemente resultando em morte programada da célula (PCD, do Inglês, programmed celular death), desse modo prevenindo o ingresso do patógeno (Schmelzer, 2002).

O presente trabalho foi realizado para identificar como ocorre a invasão e o crescimento do fungo *C. gloeosporioides* nos tecidos do feijão-caupi, genótipos BR 3 Tracueteua e TE 97 411-1E, como também para avaliar respostas bioquímicas de defesa da planta e o papel da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) na restrição do crescimento do patógeno durante a patogênese.

Material e Métodos

As sementes dos dois genótipos de feijão-caupi BR 3 Tracueteua e TE 97 411-1E foram fornecidas pela Embrapa Meio-Norte. As sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio, 0,05% de cloro ativo. O plantio foi feito em condições estéreis em casa de vegetação com médias de temperatura em torno de 25°C (noite) e - 35°C (dia). O fungo *C. gloeosporioides* foi mantido no meio batata-dextrose-ágar.

Após 12 dias de plantio, plantas sadias que não apresentavam injúria foram transferidas para uma câmara de crescimento climatizada [25°C (escuro) e - 30°C (claro), 65 ± 5 % RH, com fotoperíodo de 12 horas]. Foram aplicados 100 ml da suspensão de esporos na concentração de 1,84 x 10⁷ esporos mL⁻¹ na superfície adaxial das folhas primárias das plantas testes. Nos controles, água estéril foi usada nas mesmas condições. As folhas primárias foram coletadas até 3 semanas após a inoculação com o fungo, em triplicata, para avaliação microscópica. Para determinação das proteínas solúveis e atividade PAL foram coletadas folhas primárias controles e infectadas, 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 8 dias após inoculação (dai) com o fungo.

As folhas primárias infectadas foram coradas com 3,3-diaminobenzidina (DAB) para avaliar o acúmulo de H₂O₂ (Thordal-Christensen et al., 1997). A detecção de células autofluorescentes foi realizada segundo a metodologia descrita por Silva et al., 2002. Os compostos fenólicos foram detectados de acordo com o método descrito por Borden & Higgins, 2002.

As folhas primárias de feijão-de-corda foram maceradas com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 500 mM. O extrato obtido foi centrifugado e dialisado contra o tampão. Os teores de proteínas solúveis foram determinados seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976).

A atividade da fenilalanina amônia liase foi medida de acordo com o método descrito em El-Shora (2002).

Resultados e Discussão

As folhas primárias de ambos os genótipos apresentaram necroses após o 3º dia de inoculação com *C. gloeosporioides*. Entretanto, foi evidenciado um maior número de folhas com lesões como também com formação de massa micelial em TE 97 em relação à BR 3, na proporção de 3:1, após 7 e 10 dias de tratamento com o fungo, respectivamente (dados não mostrados). A análise microscópica sugeriu que o processo infeccioso iniciou-se com a adesão dos esporos à superfície do hospedeiro (Figura 1A). A adesão de esporos a plantas hospedeiras é uma etapa essencial para iniciação da doença em interações fungo-planta (Perfect et al., 1999). O processo de infecção por *C. gloeosporioides* foi iniciado, exclusivamente, via abertura natural dos estômatos, por tubos germinativos (Figura 1B), sem formação de apressório. Portanto, ocorrendo de modo indireto. Em algumas espécies de *Colletotrichum*, os apressórios são quiescentes, não germinam, mas os tecidos das folhas são penetrados indiretamente através dos estômatos (Latunde-Dada, 2001). As cavidades dos estômatos foram extensivamente colonizadas por ramificação de micélios em TE 97, 11 dai (Figura 2A). No genótipo BR 3, a presença de uma pequena quantidade de hifas nas cavidades dos estômatos foi detectada somente 23 dai (Figura 2B). Existem relatos na literatura de que formas de *C. gloeosporioides* colonizam seus hospedeiros, mas com uma prolongada fase sem sintomas (Sinclair, 1991). Autofluorescência dos estômatos foi observada nas folhas primárias de ambos os genótipos inoculados com o fungo (Figura 3).

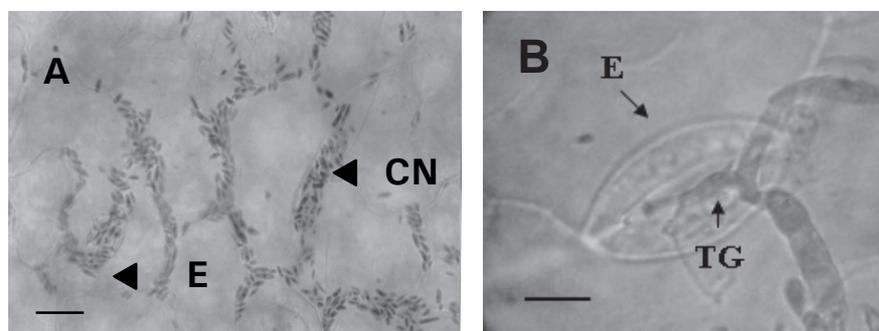


Figura 1. Colonização nos tecidos das folhas primárias de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) por *C. gloeosporioides*. (A) Conídios (CN) aderidos às folhas do genótipo BR 3, 1 dia após inoculação (dai). Barra = 20 μ m. (B) Penetração de tubos germinativos de *C. gloeosporioides* através do estômato na folha de BR 3, 4 dai. Barra: 10 μ m.

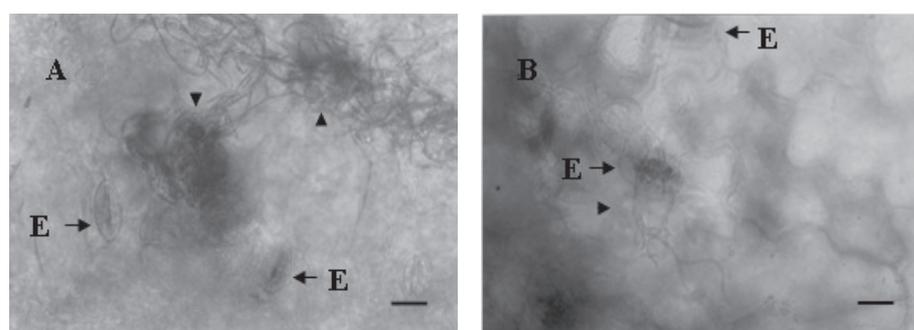


Figura 2. Ramificação de hifas (cabeça de seta) ocasionando a infecção nos estômatos (E) das folhas de TE 97, 11 dai (A) e BR 3, 23 dai (B). Barra = 20 μ m.

Isso ocorreu, provavelmente, por causa da deposição de calose (papila) associada a compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2002). O mesmo tratamento foi feito para plantas controles dos dois genótipos e a autofluorescência não foi observada. A presença de compostos fenólicos foi detectada em regiões de grande concentração de esporos (Figura 4A). O acúmulo de H_2O_2 foi observado nas regiões de grande densidade de esporos e ao redor de células apresentando HR, sendo encontrado em maior proporção e em maior número de tecidos, em BR 3, em relação ao TE 97 (Figura 4B).

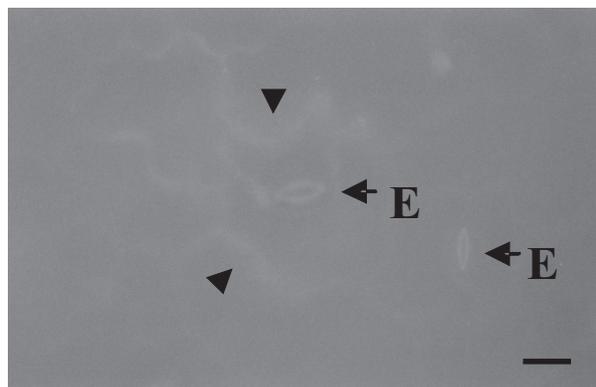


Figura 3. Autofluorescência nos estômatos e ao redor de células apresentando HR nas folhas primárias de TE 97, 3 dai, detectados por excitação no UV (luz verde). Barra = 20 μ m.

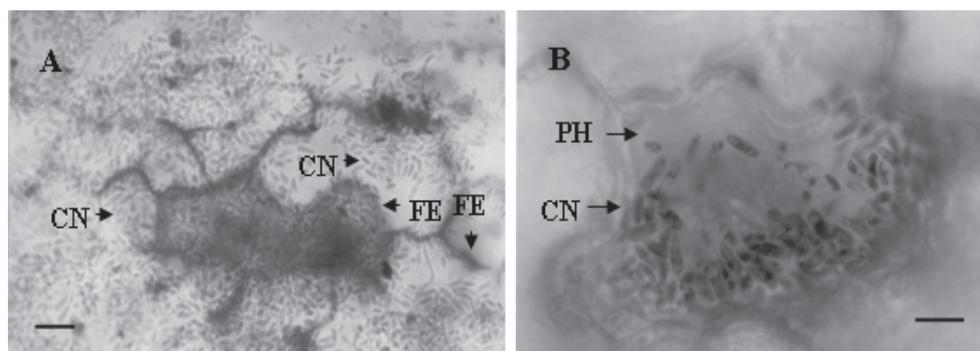


Figura 4. Respostas de defesa do feijão-caupi induzidas por *C. gloeosporioides*. (A) Deposição de compostos fenólicos (FE) nas folhas de TE 97, 3 dai. Barra = 20 μ m. (B) Acúmulo de peróxido de hidrogênio (PH) em células apresentando HR BR 3, 2 dai. Barra = 10 μ m.

Nas folhas primárias de ambos os genótipos inoculados com esporos de *C. gloeosporioides*, a atividade de PAL aumentou em dois tempos diferentes (Figura 5). Para o genótipo TE 97, o primeiro pico de atividade começou mais cedo, 24 horas após inoculação (hai), em relação ao BR 3, 48 hai, talvez porque, em TE 97, a formação do tubo germinativo primário tenha se iniciado nas primeiras 24 hai, enquanto que em BR 3, os primeiros tubos tenham sido emitidos 48 hai. Shiraishi et al. (1995) consideraram a importância do tubo germinativo primário para o processo de infecção e a influência nos níveis de PAL, da tentativa de penetração por tubos germinativos primários, em tecidos hospedeiros. A indução de PAL na interação feijão-de-corda x *C. gloeosporioides* pode ser sugerida como um resultado da expressão localizada de PAL no sítio de infecção.

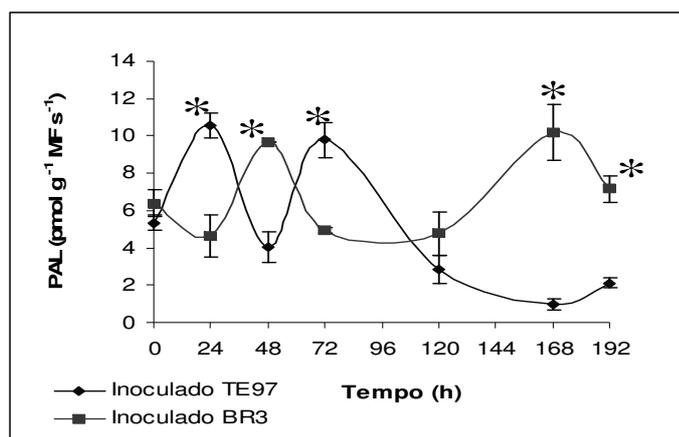


Figura 5. Atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas primárias de feijão-caupi, genótipos TE 97 e BR 3, inoculadas com esporos de *C. gloeosporioides*. Barras representam o desvio padrão entre as repetições. Asteriscos representam valores significativos p ($< 0,05$) entre os tratamentos de acordo com o teste-t de Student.

O acúmulo de H_2O_2 nas folhas inoculadas de BR 3 sugere que este composto provavelmente agiu como agente tóxico diretamente sobre o patógeno, uma vez que foi demonstrado através da análise microscópica um maior desenvolvimento do fungo em TE 97, evidenciado pela ramificação das hifas sobre os estômatos. A análise macroscópica reforça esta hipótese, quando foi observada a formação de micélios na superfície das folhas primárias infectadas de TE 97, sugerindo que o genótipo TE 97 é mais suscetível ao fungo do que BR 3.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, PADCT, PROCAD pelo apoio financeiro e ao programa PIBIC-CNPq pela concessão de bolsas aos alunos T. E de Matos e Y. R. G. Eloy.

Referências

- ATHAYDE SOBRINHO, C., VIANA, F. M. P., SANTOS, A. A. dos. Doenças do Feijão Caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.) **A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 264, 2000. (Embrapa Meio-Norte Circular Técnica, 28).
- BORDEN, S., HIGGINS, V. J. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 61, p. 227-236, 2002.
- 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.
- EL-SHORA, H.M. Properties of Phenylalanine Ammonia-Lyase from Marrow Cotyledons. **Plant Science**, v. 162, p. 1-7, 2002
- LATUNDE-DADA, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 187-198, 2001.
- PERFECT, S. E., HUGHES, H. B., O'CONNELL, R. J., GREEN, J. R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186, 1999.
- SCHMEIZER, E. Cell Polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 411-415, 2002.

SHIRAISHI, T., YAMADA, T., NICHOLSON, R. L., KUNOH, H. Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f. sp. hordei (race 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 153-162, 1995.

SILVA, M. C., NICOLE, M., GUERRA-GUIMARÃES, L. RODRIGUES Jr., C. J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, p. 169-183, 2002.

SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, v. 75, p. 220, 1991.

SINGH, B. B., EHLERS, J. D., SHARMA, B., FREIRE-FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A., TARAWALI, S. A., SINGH, B. B., KORMAWA, P. M., TAMO, M. (Eds.) **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production**. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 2002. p.22-40.

THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y., COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**, v. 11, p. 1187-1194, 1997.