

**ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE DEFESA EM CULTIVARES DE FEIJOEIRO
INOCULADAS COM *Sclerotinia sclerotiorum***

RAFAELA PRISCILA ANTONIO¹, PEDRO MARTINS RIBEIRO JÚNIOR², LETÍCIA
APARECIDA DE CASTRO LARA³, JOÃO BOSCO DOS SANTOS⁴, MARIO LÚCIO VILELA DE
RESENDE⁵ E LÍVIA DE MATOS PEREIRA⁶

RESUMO

O mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) é uma importante causa de perda de rendimento da cultura de feijão. Existem cultivares com certo nível de resistência, mas com características agrônomicas não comerciais. A resistência destas plantas pode estar relacionada ao aumento da atividade de enzimas de defesa como peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β 1,3 glucanase. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade destas enzimas de defesa em genótipos de feijoeiro resistentes e suscetíveis a *S. sclerotiorum*. Para as enzimas estudadas, o genótipo resistente Ex Rico 23 apresentou maior atividade em relação à linhagem suscetível M20. Provavelmente a resistência do genótipo resistente G122 não está relacionada somente a estas enzimas de defesa pela sua baixa atividade em relação ao Ex Rico 23. O genótipo CNPF 9506 apresentou maior atividade das enzimas quitinase e β 1,3 glucanase podendo contribuir pra resistência ao mofo branco.

Palavras-chaves: *Phaseolus vulgaris* L., Proteínas de defesa, resistência e mofo branco

INTRODUÇÃO

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma importante causa de perda de rendimento da cultura de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Este patógeno sobrevive no solo por vários anos como escleródios e tem um leque muito amplo de hospedeiros de mais de 400 espécies, incluindo muitas culturas e plantas daninhas anuais (BOLAND & HALL, 1994). O melhoramento para resistência ao mofo branco tem sido muito lento devido à baixa herdabilidade, às técnicas complexas de avaliação, à grande influência ambiental e ao uso de métodos de melhoramento ineficientes (TERÁN & SINGH, 2010). No entanto, a obtenção de cultivares resistentes ainda é a alternativa mais eficiente para o controle dessa doença.

A resistência de plantas ao ataque de patógenos pode ser entendida como a capacidade que elas desenvolveram de impedir, restringir ou retardar a penetração destes organismos em seus tecidos, diminuindo os efeitos danosos potenciais. Para se defenderem de doenças, as plantas estão equipadas com as defesas pré-formadas ou constitutivas, que são aquelas naturalmente presentes na planta, funcionando como barreiras físicas. As defesas pós-formadas ou induzidas, ausentes ou de pouca expressividade em plantas saudáveis, são aquelas que se tornam evidentes somente após a invasão do patógeno ou quando a planta é injuriada (PASCOLATI & LEITE, 1995).

Nestes casos, além da resposta hipersensitiva, que se caracteriza pelo rápido e localizado colapso do tecido vegetal em volta do local da infecção, há a formação de tiloses, papilas, halos, lignificação, fitoalexinas, o aumento na concentração ou síntese de várias proteínas relacionadas à patogênese (PRPs), dentre as quais algumas enzimas como as β 1,3 glucanases, quitinases e peroxidases (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Tais eventos e reações podem determinar o sucesso da resistência da planta contra o ataque do fitopatógeno, evitando, assim, o estabelecimento da doença (STINTZ et al., 1993).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade das enzimas de defesa, peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β 1,3 glucanase em genótipos de feijoeiro resistentes e suscetíveis a *Sclerotinia sclerotiorum*.

¹ Doutoranda em Genética e Melhoramento de Planas, DBI/UFLA, rafapris@yahoo.com.br

² Pós-doutorando em Fitopatologia, DFP/UFLA, ribeirojuniorpm@yahoo.com.br

³ Graduanda em Biologia, DBI/UFLA, letis440@hotmail.com

⁴ Professor Associado, DBI/UFLA, jbsantos@ufla.br

⁵ Professor Associado, DFP/UFLA, mlucio@dfp.ufla.br

⁶ Mestre, Bolsista CNPq DFP/UFLA, liviadematos@yahoo.com.br

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro genótipos de feijoeiro: G122 e Ex Rico 23 (fontes de resistência), M20 (suscetível) e a CNPF 9506 (reação quanto ao mofo branco desconhecida). Sementes de feijoeiro, dos respectivos genótipos, foram plantadas em vasos plásticos de 3,5 litros, contendo substrato terra:areia:estercos bovino (3:1:1). Após a emergência, cada vaso foi mantido com três plantas de feijão.

A linhagem G122 possui hábito de crescimento determinado (tipo I) (SINGH, 1982), tem origem Andina, sementes grandes, tipo rajada de fundo bege e rajas vinho. A linhagem G122 tem exibido resistência de campo ao mofo branco (STEADMAN et al., 1999). Essa resistência de campo provavelmente resulta da resistência fisiológica (MIKLAS, 2001). Além da resistência ao mofo branco, a linhagem G122, coletada na Índia como PI 163120, é também conhecida como 'Jatu Rong' e exibe tolerância ao calor (SHONNARD & GEPTS, 1994).

A linhagem Ex Rico 23 tem hábito de crescimento indeterminado, porém arbustivo, além de possuir resistência fisiológica ao mofo branco.

A linhagem M20 possui grão tipo carioca, hábito de crescimento tipo II, portadora dos alelos *Co-4²*, *Co-5* e *Co-7* que conferem resistência à antracnose além de resistência à mancha-angular, porém, é altamente suscetível ao mofo branco.

A cultivar CNPF 9506 é resistente a algumas raças de antracnose, tem porte ereto e grãos tipo carioca e não é conhecida sua reação ao mofo branco.

As plantas com 28 dias de semeadura foram inoculadas utilizando o método do *straw test*, descrito por Petzoldt & Dickson (1996).

Para determinar a atividade das enzimas, hastes das plantas foram coletadas 4, 8, 12, 24, 72 e 168 horas após a inoculação (HAI). Imediatamente após cada coleta, as hastes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da maceração.

Para a quantificação de proteínas totais e da atividade das enzimas, as hastes foram trituradas em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, 1g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual adicionou-se o tampão acetato de sódio 50mM pH 5,2 (6mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizou-se por 20 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada, a 12.000g por 15 minutos (4°C) e o sobrenadante foi utilizado como fonte enzimática.

As proteínas solúveis contidas nos extratos foram aferidas com base no ensaio de Bradford (1976), utilizando-se um padrão de albumina sérica bovina (BSA).

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX) foi determinada em microplacas de 96 cavidades de acordo com metodologia de Urbanek et al. (1991) e a atividade de polifenoloxidase (PPO) foi determinada de acordo com Gauillard et al. (1993).

A atividade de quitinase (CHI) foi determinada em microplacas de 96 cavidades utilizando-se o substrato CM-Chitin-RBV (Loewe Biochemica GmbH), de acordo com Wirth & Wolf (1990) e a atividade da β -1,3-glucanase (GLU) foi determinada de modo análogo ao da quitinase, apenas com substituição do substrato para CM-Curdlan-RBB (Loewe Biochemica GmbH).

As atividades de todas as enzimas foram analisadas considerando como 100% as atividades das mesmas na linhagem M20, suscetível ao mofo branco. Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicatas.

O experimento foi instalado em delineamento de blocos casualizados com 3 repetições e 3 plantas por parcela por tempo de coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas linhagens resistentes, Ex Rico 23 e G122, foi observado aumento na atividade da enzima de defesa peroxidase às 4 horas após inoculação (HAI), sendo que a atividade desta enzima, quando comparada à atividade da linhagem suscetível M20, continuou alta até 168 HAI (Figura 1A). Na linhagem G122 essa atividade manteve-se mais alta que a atividade ocorrida na M20 de 12 até 72 HAI. A atividade da peroxidase na linhagem CNPF 9506 foi menor em todos os tempos de avaliação.

A peroxidase de plantas participa de diversos processos fisiológicos, dentre eles a formação de lignina e são freqüentemente utilizadas como marcadores enzimáticos para os estudos da resistência (RASMUSSEN et al., 1995). A atividade desta enzima é freqüentemente aumentada em resposta aos estresses, ao ataque de patógenos, sendo a proteção celular contra reações oxidativas também uma das principais funções desta enzima (ANTEROLA & LEWIS, 2002).

Para a atividade de polifenoloxidase praticamente não houve diferença entre as linhagens. Exceto pela linhagem Ex Rico 23 que apresentou um pico de atividade 12 HAI e CNPF 9506 as 72 HAI (Figura 1B). A polifenoloxidase é liberada dos tilacóides após a ruptura da célula pelo processo de penetração do patógeno, oxidando os compostos fenólicos à quinonas, as quais são muito mais tóxicas aos microrganismos do que o próprio fenol original podendo contribuir na resistência (CARDOSO & GARRAWAY, 1977).

A atividade da β 1,3 glucanase foi maior nos genótipos CNPF 9506 as 24 e 72 HAI, seguida pelo Ex Rico 23 nestes mesmos tempos. Para a atividade desta enzima na linhagem G122 ocorreu um pico 72 HAI (Figura 1C).

As 4 e 8 HAI a atividade da quitinase estava mais alta nos genótipos CNPF 9506 e Ex Rico 23 que nas demais linhagens, voltando a aumentar 72 HAI (Figura 1D). Para a atividade desta enzima, praticamente não se observou diferença entre a linhagem G122 e M20.

A quitinase e a β 1,3 glucanase apresentam ação direta contra patógenos, degradando a parede celular, com o objetivo de impedir o estabelecimento do patógeno na planta. Neste processo, polímeros de N-acetilglucosamina e β 1,3 glucana, provenientes da parede celular de fungos ou bactérias degradadas por estas enzimas, podem funcionar como eliciadores e ativar outros mecanismos de defesa como as fitoalexinas (OKINAKA et al., 1995).

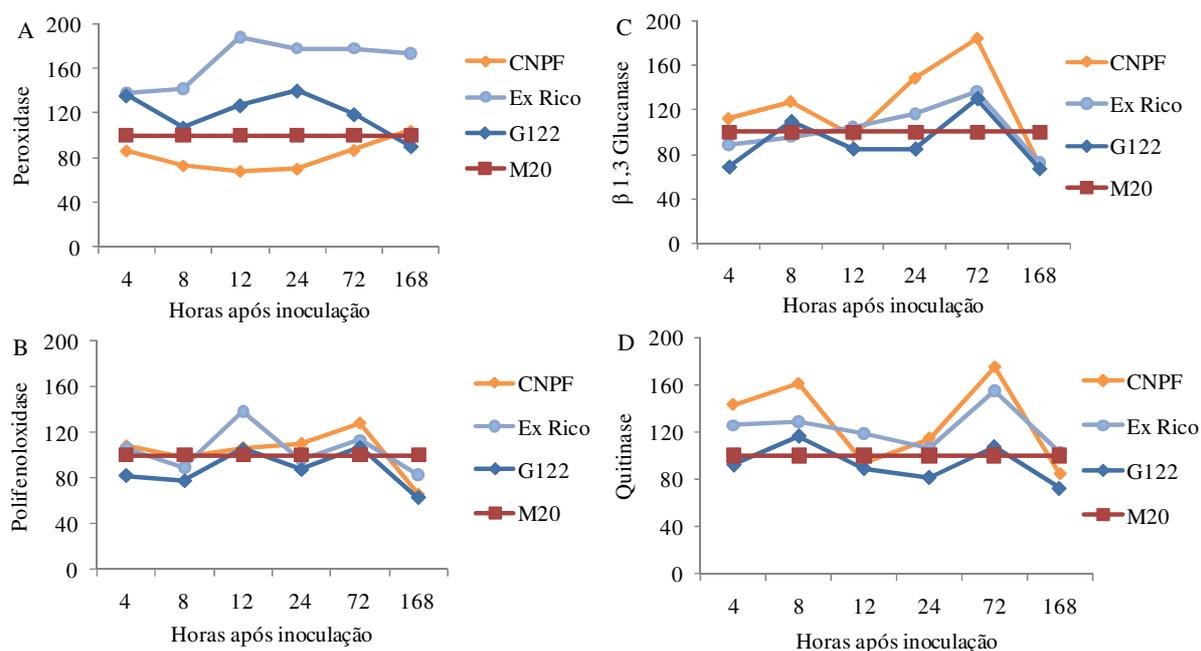


FIGURA 1 Atividade relativa de peroxidase de guaiacol (A), polifenoloxidase (B), β 1,3 glucanase (C) e quitinase (B) em hastes de linhagens de feijoeiro (CNPF 9506, Ex Rico 23, G122 e M20) inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum* nos tempos de 4, 8, 12, 24, 72 e 168 horas após inoculação. Considerou-se as atividades das enzimas na linhagem suscetível M20 como 100%. Médias de três repetições.

CONCLUSÃO

Para as enzimas estudadas, peroxidase, polifenoloxidase, quitinase e β 1,3 glucanase, a linhagem resistente Ex Rico apresentou maior atividade em relação à linhagem suscetível M20.

Provavelmente a resistência da linhagem G122 não está relacionada somente a estas enzimas de defesa pela sua baixa atividade na maioria delas em relação ao Ex Rico 23.

O genótipo CNPF 9506 apresentou maior atividade das enzimas quitinase e β 1,3 glucanase podendo contribuir pra resistência ao mofo branco.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ANTEROLA, A. M.; LEWIS, N. G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/ mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, n. 3, p. 221-294, Oct. 2002.

BOLAND, G.J. and HALL R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, n.1 p93-108, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CARDOSO, C.O.N.; GARRAWAY, M.O. Bioassay using phenolic compounds and phytoalexins produced in bean plants infected with *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyd. & Hans. **Summa Phytopathologica** 3:103-116. 1977.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 215, p. 59-65. 1993

Miklas P.N., Delorme R., Johnson W.C. and Gepts P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold dry bean. **Crop Science**, v. 41, p.309–315, 2001.

OKINAKA, Y.; MIMORI, K.; TAKEO, K.; KITAMURA, S.; TAKEUCHI, Y.; YAMAOKA, N.; YOSHIKAWA, M. A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant [β]-1,3-endoglucanase. **Plant Physiology**, Rockville, v.109, n. 3, p. 839-845, Nov. 1995.

PASCOLATI, S. F. e LEITE, B. **Hospedeiros: mecanismos de resistência**. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. (Eds). Manual de Fitopatologia - princípios e conceito. São Paulo. Ceres. p. 417-453. 1995.

Petzoldt, R., and M.H. Dickson.. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annu. Rpt. Bean Improv. Coop.**, v.39, p.142-143, 1996.

RASMUSSEN, C.B.; DUNFORD, H.B.; WELINDER, K.G. Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol. **Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 4022–4029, Mar. 1995.

SHONNARD, G.C. AND GEPTS, P. Genetics of heat tolerance during reproductive development in common bean. **Crop Science**. v.34, n.2, p.1168–1175, 1994.

SINGH, S.P. A key for identification of different growth habits of *Phaseolus vulgaris* L. **Annual Reports Bean Improvement Cooperative**, v.25, p.92–95, 1982.

STEADMAN, J.R.; RAND, R.E; JAMES, R.V.; STEVENSON, R.W.; KOLKMAN, J.M.; KELLY J.D.; MYERS, J.R.; AND MAINZ, R.. Bean white mold nursery. **Annual Reports Bean Improvement Cooperative**, v.42, p.49–50, 1999.

STINTZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, p. 687-706, 1993.

TERÁN, H. and SINGH, S.P. Recurrent selection for physiological resistance to white mould in dry bean. **Plant Breeding**, v.129, p.327-333, 2010.

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

VAN LOON, L.C. and E.A. VAN STRIEN. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, 55, 85-97. , 1999

WIRTH, S. J. and WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 12, n. 3/4, p. 197-205, Dec. 1990.