



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

APARECIDA SIMONE MARTINS MIRANDA

BENZOTIADIAZOLE (BTH) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-DE-  
CORDA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.] AO NEMATÓIDE *MELOIDOGYNE*  
*INCOGNITA*, RAÇA 1

FORTALEZA-CEARÁ

2007

APARECIDA SIMONE MARTINS MIRANDA

BENZOTIADIAZOLE (BTH) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-DE-CORDA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.] AO NEMATÓIDE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, RAÇA 1

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu A. de Oliveira

FORTALEZA-CEARÁ

2007

M64b Martins-Miranda, Aparecida Simone

Benzotiadiazole (BTH) na indução de resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] ao nematóide *Meloidogyne incognita*, raça 1 / Aparecida Simone Martins Miranda, 2007.  
212 f.; il.; color.; enc.

Orientado: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Área de concentração: Bioquímica

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2007.

1. Bioquímica. 2. Defesa vegetal. 3. Proteínas de defesa vegetal. 4. Lignina. I. Oliveira, José Tadeu Abreu (orientador). II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. III. Título.

**CDD 574.192**

APARECIDA SIMONE MARTINS MIRANDA

BENZOTIADIAZOLE (BTH) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-DE-CORDA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.] AO NEMATÓIDE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, RAÇA 1

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

---

Aparecida Simone Martins Miranda

Tese aprovada em 07/05/2007

---

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará  
Orientador

---

Dra. Ilka Maria Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará  
Examinadora

---

Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira  
Universidade Federal do Ceará  
Examinador

---

Dr. Francisco das Chagas de Oliveira Freire  
EMBRAPA/Agroindústria Tropical  
Examinador

---

Dr. Maurício Pereira Sales  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Examinador

Dedico com carinho

A *Deus* por me guiar, ao meu *Pai* pelo exemplo de caráter, minha *Mãe* pelo amor e dedicação, aos meus *Irmãos* pelo carinho.

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, pela orientação, dedicação, incentivo e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos e ao Professor Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira pela incansável colaboração e sugestões apresentadas, na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Maurício Pereira Sales e ao Pesquisador Dr Francisco das Chagas de Oliveira Freire, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho, além das valiosas sugestões para correção do mesmo.

De forma muito especial a José Edvar Monteiro Junior pelo carinho, dedicação, cumplicidade e compreensão demonstradas durante todo o tempo de execução deste trabalho.

Em especial as grandes amigas: Ana Lúcia Horta Barreto, de quem recebi meus primeiros ensinamentos em Bioquímica; Darcy Mayra Furtado Gondim e Hévila de Oliveira Sales, pela ajuda e carinho e Lúcia Betânia da Silva Andrade, por ajudar e alegrar os trabalhos de laboratório.

De modo especial aos amigos Fábio Rossi Cavalcanti, Cléberon de Freitas Fernandes, Carlos Eduardo Souza, Aletheia Carizia e Cristina Paiva pela ajuda e amizade.

Ao Dr. Dagoberto Saunders de Oliveira pelos ensinamentos, ajuda e carinho.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, Aline, Fernando, Fredy, Gabriela, Germano, Gina, Hélio, Ivna, Raissa, Silvio, Thiago, Vadjah, Wladimir e Ygor.

Aos estudantes dos laboratórios de Toxinas Vegetais e Nutrição de Plantas e Estresse Ambiental. Em especial ao Dr. João Batista pela colaboração e sugestões.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelo apoio e atenção prestada.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que tanto contribuíram para minha formação científica. Com carinho ao Professor Dr. Francisco Campos pelas sugestões e conselhos.

Ao grande amigo Ronaldo Miranda pelo carinho e apoio.

Agradeço com carinho a Família Martins: Meus Pais, Vicente B. Martins e Maria A. Martins, meus irmãos, Siomar, Sinely, Cíntia e os novos membros da família Viviane e Guilherme.

E a Deus que é fonte de sabedoria para todas as ciências.

Este Trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela bolsa de Pós-graduação concedida à autora desta tese.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Meio-Norte/PI e EMBRAPA - Agroindústria Tropical/CE.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi realizada esta pesquisa.

# BENZOTIADIAZOLE (BTH) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-DE-CORDA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.] AO NEMATÓIDE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*, RAÇA 1

---

## RESUMO

O feijão-de-corda é uma leguminosa economicamente importante para vários países, dentre os quais África e Brasil são os maiores produtores. Entretanto, sua produção é prejudicada pela ação de patógenos incluindo vírus, fungos, bactérias, nematóides e ainda insetos. Com relação aos nematóides, particularmente os nematóides das galhas, as perdas na agricultura mundial chegam a 100 bilhões de dólares por ano e o uso de nematicidas, além de caro, é muito danoso ao meio ambiente. Assim, a busca por estratégias alternativas ao uso de nematicidas tem sido feita. O ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH), conhecido como ativador de plantas, tem sido empregado na indução de respostas de defesa de várias culturas contra uma variedade de patógenos. O BTH foi utilizado neste trabalho a fim de avaliar sua capacidade de induzir respostas de defesa no feijão-de-corda, bem como, seus efeitos sobre a produção e desenvolvimento das plantas. Em seguida, o potencial do BTH em proteger a planta contra o nematóide *Meloidogyne incognita*, raça 1, foi analisado. A investigação de uma possível ação direta do produto sobre os nematóides também foi realizada. BTH, em concentrações variando de 0,0 a 5,0 mM de ingrediente ativo, foi utilizado em tratamentos que consistiram, ou na pulverização da parte aérea de plantas ou, embebição de sementes. As duas formas de tratamento resultaram em alterações nos níveis de proteínas relacionadas a patogêneses, enzimas antioxidativas e proteínas que participam da lignificação dos tecidos. Além disso, a determinação do conteúdo de lignina mostrou que houve depósito do polímero em folhas secundárias. Aos 30 dias após inoculação (DAI), reduções de 11,1 e 19,7% no número de galhas foram observadas com os tratamentos de 0,3 e 0,5 mM de BTH, respectivamente. Redução de 34,2% no número de ovos foi observada aos 60 DAI em plantas tratadas com BTH a 0,5 mM. BTH, em concentrações maiores que 0,5 mM, contudo, afetou negativamente parâmetros relacionados ao desenvolvimento e produção das plantas. Aplicação direta de BTH nos nematóides, não mostrou nenhuma alteração sobre sua mobilidade e mortalidade. Estes resultados sugerem que o BTH provavelmente poderá ser empregado na proteção de plantas de feijão-de-corda por meio da indução de suas respostas de defesa, reduzindo assim, as perdas causadas por *M. incognita* na produção desta cultura. Contudo, cuidado com relação aos níveis e formas de aplicação do BTH deve ser levado em consideração a fim de evitar possíveis efeitos fitotóxicos do produto.

BENZOTHIADIAZOLE (BTH) AS A COWPEA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.]  
DEFENSE INDUCER AGAINST THE ROOT-KNOT NEMATODE *MELOIDOGYNE*  
*INCOGNITA* RACE 1

---

ABSTRACT

Cowpea is an economically important leguminous to several countries around world, including Africa and Brazil, the two major producers. Cowpea's breeding, however, is considerably hampered by pathogen, like nematodes and pests. Root-Knot nematodes are responsible for \$100 billion dollars loss per year and nematicide use is expansive and hazardous. Thus, the search for new strategies to nematode control is extremely necessary. Benzo [1,2,3] thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (BTH), it is known as a plant activator and its use as an inducer of plant defense mechanisms against a number of pathogens, has already been employed. BTH, was used in this work in order to evaluate its ability to induce defense responses in cowpea, as well as the impacts on the plant development and production. Following, the capacity of BTH to protect cowpea plants against *Meloidogyne incognita* and the direct effects of the chemical on nematodes were also investigated. Shoots of cowpea plants were exposed to BTH at concentrations ranging from 0.0 to 5.0 mM. Alternatively, seeds were soaked in BTH solutions at same concentrations. Pathogenesis related proteins, anti-oxidative enzymes and lignification-related proteins as well as lignin content's were all affected by the BTH treatments in both experimental trials. 11.1 and 19.7% reductions in the gall number were observed with 0.3 and 0.5 mM BTH, respectively, at 30 days after inoculation (DAI). At 60 DAI, a 34.2% reduction in the egg number was detected with 0.5 mM BTH treatment. Beyond 0.5 mM concentrations, however, BTH causes significant reductions in plant development and production. Direct application of BTH on the nematodes, did not showed any significant alterations in the mobility and mortality. These findings suggests that the use of BTH probably should result in a more effective protection of cowpea plants against *M. incognita*. A reasonable explanation for this hypothesis is the induction of biochemical defense responses observed in this study. However, the levels and the form of application of the BTH needs to be taken into account to avoid possible phytotoxic effects of the product.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
2.1	Tratamento, através de pulverização da parte aérea de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], com 250 µL das soluções aquosas de BTH no décimo dia após plantio.	50
2.2	Tratamento de sementes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] através de imersão, por 24 horas, em soluções aquosas de BTH.	53
2.3	Semeadura das sementes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], previamente tratadas com diferentes concentrações de BTH, em papel de germinação (Germitest <sup>®</sup> ) (A), parte aérea das plantas, oito dias após semeadura (B).	54
2.4	Metodologia para determinação de lignina em folhas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] após terem sido descoradas (A e B) e coradas com reagente de Schiff (C). As leituras (D e E) foram feitas com o auxílio de colorímetro.	61
2.5	Proteínas solúveis totais de folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH.	63
2.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) de extratos de proteínas solúveis totais de folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH. Setas indicam diferenças no padrão de bandas.	64
2.7	Atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH.	66
2.8	Atividade de peroxidase (POX) em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH.	68
2.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelado para atividade peroxidásica (POX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, tratado com diferentes concentrações de BTH. Setas indicam diferentes isoformas.	69
2.10	Atividade de β-1,3-glucanase (GLU) em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH.	70
2.11	Atividade de catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (C) de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH.	72
2.12	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelado para atividade de superóxido dismutase (SOD) em folhas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH. Setas indicam diferentes isoformas.	73

2.13	Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) revelada para atividade peroxidásica de cotilédones de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A), (B), (C) e (D) correspondem 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	76
2.14	Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de eixos embrionários de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 1 e 2 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	77
2.15	Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de caule de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	77
2.16	Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de folhas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	78
2.17	Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de raízes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	78
2.18	Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica em extratos totais de cotilédones de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A), (B), (C) e (D) correspondem a 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	80
2.19	Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica em extratos totais de eixos embrionários de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 1 e 2 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	81
2.20	Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica em extratos totais de caule de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	81
2.21	Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica de extratos totais de folhas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	82
2.22	Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica de extratos totais de raízes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	82

2.23	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de cotilédones de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A), (B), (C) e (D) correspondem a 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	84
2.24	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de eixos embrionários de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem a 1 e 2 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	85
2.25	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de caule de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem a 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	85
2.26	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de folhas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem a 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	86
2.27	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de raízes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem a 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.	86
2.28	Concentração de lignina em folhas primárias de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem a folhas primárias coletadas 10 e 15 dias após tratamento (DAT), respectivamente.	88
2.29	Concentração de lignina em folhas secundárias de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, pulverizado com diferentes concentrações de BTH. (A) e (B) correspondem a folhas secundárias coletadas 10 e 15 dias após tratamento (DAT), respectivamente.	89
2.30	Concentração de lignina em folhas secundárias de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundas de sementes previamente imersas em diferentes concentrações de BTH. As folhas foram coletadas 30 dias após tratamento (DAS).	90
3.1	Condições de plantio em campo de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.]. (A) Sistema de irrigação, (B) tratamento com pulverização da parte aérea, 10 dias após plantio (DAP); (C) e (D) plantas com 35 e 45 DAP, respectivamente.	118
3.2	Determinação da transpiração foliar e condutância estomática em plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] 10 e 27 dias após tratamento com BTH. (A) detalhes do porômetro (LICOR LI-1600); (B) e (C) medidas realizadas com utilização de porômetro em plantas cultivadas em campo.	120

3.3	Tratamento de sementes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] através de imersão, por 24 horas, em soluções aquosas de BTH. A relação utilizada foi de 10 mL de solução de BTH ou água grau Milli-Q (controle) por semente.	122
3.4	Plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] provenientes de sementes tratadas com BTH cultivadas em condições de casa de vegetação. (A) Plantas com 12 dias após plantio (DAP) e (B) plantas com 24 DAP.	123
3.5	Transpiração foliar (A) e resistência estomática (B) em plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cultivadas em condições de campo e tratadas com diferentes concentrações de BTH. Avaliações feitas 10 e 27 dias após plantio (DAP).	126
3.6	Avaliação do desenvolvimento de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] tratadas com diferentes concentrações de BTH. Aos 10 dias após plantio e cultivadas em condições de campo. Avaliações de (A) massa do caule, (B) comprimento do caule e (C) massa das folhas de uma planta, foram feitas 20 dias após tratamento.	127
3.7	Avaliação da produção de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cultivadas em condições de campo e tratadas com diferentes concentrações de BTH. (A) peso da vagem; (B) comprimento da vagem; (C) número de sementes por vagem e (D) massa da matéria fresca média da semente.	128
3.8	Avaliação da produção de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] cultivadas em condições de campo e tratadas com diferentes concentrações de BTH. (A) número de vagens por tratamento; (B) número de vagens por planta; (C) número total de sementes por tratamento e (D) peso total de sementes por tratamento.	129
3.9	Sementes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] logo após tratamento de 24 horas por imersão em soluções aquosas de BTH. (A) Massa da matéria fresca de sementes; (B) sementes logo após terem sido retiradas das soluções de tratamento.	131
3.10	Sementes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas.	132
3.11	Massa da matéria fresca de cotilédones de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.] provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. (A) Um; (B) Dois; (C) três; (D) quatro; (E) cinco dias após plantio.	133
3.12	Plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. Plantas com três (A), quatro (B) e cinco (C) DAP.	134
3.13	(A) Massa de eixos embrionários coletados aos dois DAP e de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], coletadas aos (B) três e (C) quatro DAP, provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas.	135
3.14	Comprimento da radícula de plântulas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. (A) Dois (B) três e (C) quatro DAP.	136

3.15	Avaliação do desenvolvimento de caules de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. Massa do caule, (A) cinco, (B) quinze DAP e (C) comprimento do caule quinze DAP.	138
3.16	Massa das raízes de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. (A) Cinco, (B) quinze e (C) 30 DAP.	139
3.17	Avaliação do desenvolvimento de folhas primárias de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. Massa das folhas de uma planta, (A) cinco, (B) quinze DAP e área de folha (C) cinco e (D) quinze DAP.	140
3.18	Plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], com quinze DAP, provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH durante 24 horas. (A) e (B) Parte aérea e (C) folhas. À esquerda plantas controles e a direita plantas provenientes do tratamento de sementes com 5,0 mM de BTH.	141
3.19	Avaliação do desenvolvimento foliar de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. (A) Massa e (B) área de folhas secundárias, quinze DAP e (C) massa da parte aérea de plantas trinta DAP.	142
4.1	Sementes de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.]. À esquerda: genótipos TE 97 411- 1E, à direita: CE-31.	158
4.2	Raízes de quiabeiro ( <i>Abelmoschus esculentus</i> ) cultivar Santa Cruz 47, inoculadas com <i>Meloidogyne incognita</i> , apresentando galhas típicas que evidenciam o sucesso da infecção causada pelo nematóide.	160
4.3	Métodos para obtenção de ovos (A) e de juvenis de segundo estágio (J2) (B) de <i>Meloidogyne incognita</i> .	163
4.4	Tratamento, através de pulverização da parte área de plantas de feijão-de-corda [ <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], com 250 µL das soluções aquosas de BTH, no décimo dia após plantio (DAP).	165
4.5	Método aplicado para avaliação da infecção causada por <i>Meloidogyne incognita</i> em raízes de feijão-de-corda. (A) Contagem do número de galhas e massas de ovos em raízes com 30 DAI. (B) Avaliação do número de ovos em raízes coletadas com 60 DAI.	168
4.6	Efeito do tratamento foliar com BTH nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre o feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ), genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com o nematóide <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 1. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado.	173
4.7	Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre os sintomas de infecção em raízes de feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ), genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após pós-inoculação com o nematóide <i>Meloidogyne incognita</i> , raça 1. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado.	174

- 4.8 Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre a massa da matéria fresca do sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE0,0), é, também, apresentado. 175
- 4.9 Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre número de galhas presentes no sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado. 176
- 4.10 Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre número de massas de ovos presentes no sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado. 177
- 4.11 Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre número de ovos presentes no sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 60 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado. 178

## LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1.1	Famílias de proteínas relacionadas a patogêneses (PR-proteínas)	11
1.2	Interações planta-patógenos nas quais o BTH induz resistência	18
4.1	Efeito das diferentes concentrações de BTH na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> , raças 1 e 4	170
4.2	Efeito das diferentes concentrações de BTH na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> , raças 1 e 4	171

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

APX	Ascorbato peroxidase
BSA	Albumina sérica bovina
BTH	ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico s-metil éster - Bion <sup>®</sup>
CAT	Catalase
DAI	Dias após inoculação
DAP	Dias após plantio
DAS	Dias após semeadura
DAT	Dias após tratamento
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol bis ( $\beta$ -amino etilenoéter) tetracético
GLU	$\beta$ -1,3-glucanase
HR	Resposta hipersensitiva
i. a.	Ingrediente ativo
NBT	<i>p</i> -nitro blue tetrazolium
PAL	Fenilalanina amônia liase
PCD	Morte celular programada
POX	Peroxidase
PR-Proteínas	Proteínas relacionadas à patogênese
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistência sistêmica adquirida
SOD	Superóxido dismutases
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletlenodiamina
UAP	Unidade de atividade peroxidásica

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xv
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xvi
CAPÍTULO 1 – REVISÃO LITERÁRIA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS	
1.1 <u>INTRODUÇÃO</u>	2
1.2 <u>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</u>	4
1.2.1 <u>Interação Planta-Patógeno</u>	4
1.2.2 <u>Mecanismo de Defesa Vegetal</u>	5
1.2.2.1 Resposta Hipersensitiva (HR)	6
1.2.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	7
1.2.2.3 Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)	9
1.2.2.4 Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-proteínas)	10
1.2.2.5 Lignificação	13
1.2.2.6 Fenilalanina Amônia Liase (PAL)	14
1.2.3 <u>Indução de Resistência em Plantas</u>	14
1.2.4 <u>Ácido (1,2,3)-Benzotiadiazol-7-Carbotioico S-metil Éster (BTH), como Indutor de Resistência</u>	16
1.2.5 <u>Feijão-de-corda</u>	20
1.2.6 <u>Nematóides das Galhas</u>	23
1.3 <u>CONCLUSÃO</u>	26
1.4 <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	27
CAPÍTULO 2 - EFEITO DO BTH SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DO FEIJÃO-DE-CORDA [VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP.]	
2.1 <u>INTRODUÇÃO</u>	42
2.2 <u>MATERIAIS</u>	48
2.2.1 <u>Material Vegetal</u>	48
2.2.2 <u>Reagentes Químicos</u>	48
2.3 <u>MÉTODOS</u>	49
2.3.1 <u>Experimento I: Tratamento Foliar de Plantas de Feijão-de-Corda com BTH</u>	49
2.3.1.1 Condições de Plantio	49
2.3.1.2 Pulverização com BTH e Coleta das Plantas	49
2.3.1.3 Preparação dos Extratos Protéicos	51
2.3.2 <u>Experimento II: Tratamento das Sementes de Feijão-de-Corda com BTH</u>	51

2.3.2.1	Tratamento das Sementes	51
2.3.2.2	Condições de Plantio	52
2.3.2.3	Coleta das Plantas	55
2.3.2.4	Preparação dos Extratos Protéicos	55
2.3.3	<u>Dosagem de Proteínas Solúveis Totais</u>	56
2.3.4	<u>Determinação da Atividade de Peroxidases (POX, EC 1.11.1.7)</u>	56
2.3.5	<u>Determinação da Atividade de <math>\beta</math>-1,3-Glucanase (GLU, EC 3.2.1.6)</u>	56
2.3.6	<u>Determinação da Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.11)</u>	57
2.3.7	<u>Determinação da Atividade de Fenilalanina Amônia Liase (PAL, EC 4.3.1.5)</u>	58
2.3.8	<u>Eletroforese Unidimensional de Proteínas Solúveis Totais</u>	58
2.3.9	<u>Atividades Enzimáticas Reveladas em Géis de Eletroforese</u>	59
2.3.10	<u>Avaliação dos Teores de lignina</u>	60
2.3.11	<u>Análises Estatísticas</u>	60
2.4	<u>RESULTADOS</u>	62
2.4.1	<u>Efeito do Tratamento Foliar com BTH nas Atividades Enzimáticas</u>	62
2.4.1.1	Proteínas Solúveis Totais	62
2.4.1.2	Fenilalanina Amônia Liase	65
2.4.1.3	PR-proteínas	67
2.4.1.4	Enzimas Envolvidas nas Respostas ao Estresse Oxidativo	71
2.4.2	<u>Efeito do Tratamento das Sementes com BTH sobre as Atividades Enzimáticas</u>	74
2.4.2.1	Peroxidase (POX)	74
2.4.2.2	Catalase (CAT)	79
2.4.2.3	Superóxido Dismutase (SOD)	83
2.4.3	<u>Acúmulo de Lignina em Folhas de Feijão-de-corda Tratadas com BTH</u>	87
2.5	<u>DISCUSSÃO</u>	91
2.5.1	<u>Proteínas Solúveis Totais</u>	92
2.5.2	<u>Fenilalanina Amônia Liase (PAL)</u>	92
2.5.3	<u>PR-Proteínas</u>	93
2.5.3.1	Peroxidase (POX)	93
2.5.3.2	$\beta$ -1,3-glucanase	95
2.5.4	<u>Enzimas Envolvidas no Estresse Oxidativo</u>	96
2.5.4.1	Catalase (CAT)	96
2.5.4.2	Superóxido Dismutase	97
2.5.5	Lignina	97
2.6	<u>CONCLUSÃO</u>	99
2.7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	100

CAPÍTULO 3 - EFEITO DO BTH NO DESENVOLVIMENTO PLANTAS DE FEIJÃO-DE-CORDA  
[*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.]

3.1	<u>INTRODUÇÃO</u>	112
3.2	<u>MATERIAIS</u>	116
3.2.1	<u>Material Vegetal</u>	116
3.2.2	<u>Reagentes Químicos</u>	116
3.3	<u>MÉTODOS</u>	117
3.3.1	<u>Experimento I - Efeito do Tratamento Foliar com BTH sobre o Desenvolvimento e Produção de Plantas de Feijão-de-corda</u>	117
3.3.1.1	Condições de Plantio	117
3.3.1.2	Tratamento das Plantas	117
3.3.1.3	Avaliação da Interferência do Tratamento com BTH na Transpiração Foliar e Resistência Estomática.	119
3.3.1.4	Coleta e Avaliação do Efeito do Tratamento com BTH no Desenvolvimento e Produção de Sementes	119
3.3.2	<u>Experimento II: Efeito do Tratamento de Sementes com BTH sobre o Desenvolvimento de Plantas de Feijão-de-corda.</u>	121
3.3.2.1	Tratamento das Sementes	121
3.3.2.2	Condições de Plantio	121
3.3.2.3	Coleta e Avaliação do Desenvolvimento das Plantas	124
3.3.3	<u>Análises Estatísticas</u>	124
3.4	<u>RESULTADOS</u>	125
3.4.1	<u>Efeito do Tratamento Foliar com BTH sobre o Desenvolvimento e Produção de Plantas de Feijão-de-corda</u>	125
3.4.2	<u>Efeito do Tratamento de Sementes com BTH sobre o Desenvolvimento de Plantas de Feijão-de-corda</u>	130
3.5	<u>DISCUSSÃO</u>	143
3.6	<u>CONCLUSÃO</u>	145
3.7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	146

CAPÍTULO 4 - BTH COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO-DE-CORDA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.] CONTRA O NEMATÓIDE DAS GALHAS  
*MELOIDOGYNE INCOGNITA*, RAÇA 1

4.1	<u>INTRODUÇÃO</u>	152
4.2	<u>MATERIAIS</u>	157
4.2.1	<u>Material Vegetal</u>	157
4.2.2	<u><i>Meloidogyne incognita</i></u>	157
4.2.3	<u>Reagentes Químicos</u>	157
4.3	<u>MÉTODOS</u>	158
4.3.1	<u>Manutenção das Culturas de Nematóides</u>	159
4.3.2	<u>Preparo do Inóculo</u>	161
4.3.2.1	Obtenção de Ovos de <i>M. incognita</i>	161

4.3.2.2	Obtenção dos Juvenis de Segundo Estágio (J2) de <i>M. incognita</i>	161
4.3.3	<u>Avaliação da Mobilidade e Mortalidade de Juvenis de Segundo Estágio (J2) de <i>M. incognita</i>, Raças 1 e 4</u>	162
4.3.4	<u>Uso do BTH como Indutor de Resistência em Feijão-de-corda Contra o nematóide <i>M. incognita</i>.</u>	164
4.3.4.1	Condições de Plantio	164
4.3.4.2	Tratamento das Plantas	164
4.3.4.3	Inoculação das Plantas	166
4.3.4.4	Coleta e Avaliação da Infecção	166
4.3.5	<u>Análises Estatísticas</u>	167
4.4	<u>RESULTADOS</u>	169
4.4.1	<u>Efeito Direto do BTH sobre a Mobilidade e Mortalidade de Nematóides <i>M. incognita</i>, Raça 1 e Raça 4</u>	169
4.4.2	<u>Uso do BTH como Indutor de Resistência em Feijão-de-corda Contra o Nematóide <i>M. incognita</i></u>	169
4.5	<u>DISCUSSÃO</u>	179
4.6	<u>CONCLUSÃO</u>	184
4.7	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	185
	<u>CONCLUSÃO FINAL</u>	193



# **CAPÍTULO 1**



---

REVISÃO LITERÁRIA DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A  
PATÓGENOS

## 1.1 – INTRODUÇÃO

Plantas ativam seus mecanismos de defesa em decorrência da aplicação de elicitores, danos mecânicos ou ataque por microrganismos e insetos. Estes mecanismos incluem ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR), síntese e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e enzimas envolvidas no reforçamento da parede celular, através da deposição de lignina, como a fenilalanina amônia liase (PAL) (Bowles, 1990). Além disso, outras respostas de defesa envolvendo o acúmulo rápido e transiente de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de regulação dos níveis de ROS são ativadas. O acúmulo de ROS pode desencadear o processo de resposta hipersensitiva (HR) um tipo de morte celular programada prejudicial, principalmente, a patógenos biotróficos.

Moléculas que atuam como elicitoras, ou seja, ativadoras destes mecanismos são exploradas quanto ao seu potencial na indução de resistência em plantas a patógenos. Vários indutores químicos, incluindo o ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH), são estudados quanto ao potencial de sua utilização como defensivos agrícolas em diferentes culturas vegetais. O BTH, um análogo do ácido salicílico, tem se destacado em decorrência de seu baixo grau de fitotoxicidade, proteção de diferentes vegetais contra uma ampla gama de patógenos, além de apresentar baixa toxicidade ao meio ambiente e à saúde humana.

Apesar do grande número de estudos relacionados à ação de elicitores químicos na ativação do mecanismo de defesa natural das plantas, algumas culturas vegetais de grande importância na alimentação humana ainda não foram enquadradas nestas pesquisas. Um exemplo é o feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers], uma importante leguminosa na agricultura do Nordeste Brasileiro, pouco estudada no que se refere à indução de resistência. O uso de compostos capazes de potencializar as defesas naturais no feijão-de-corda pode representar estratégia promissora no controle de importantes pragas desta cultura, como vírus, fungos, bactérias e nematóides. Assim o estudo da interação planta-patógeno, frente ao tratamento com BTH, poderá gerar subsídios para o desenvolvimento de

estratégias efetivas de controle de doenças e pragas com baixo custo e redução no uso de poluentes ambientais.

## 1.2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.2.1 - Interação Planta-Patógeno

As plantas continuamente se defendem do ataque de patógenos e pragas, tais como vírus, fungos, bactérias, nematóides, predadores herbívoros e até mesmo de outras plantas. Todas as partes da planta podem entrar em íntimo contato com estes organismos. Cada patógeno desenvolve um meio específico para invadir uma planta. Essa invasão pode provocar doenças que produzem sintomas característicos do agente patogênico (Talarczyk e Hennig, 2001).

O sucesso da interação planta-patógeno pode ser atribuído a vários fatores, como: eficientes mecanismos de ataque; alta taxa de reprodução e crescimento durante a permanência do patógeno na planta; alta capacidade de diversidade genética; mutações; mecanismo de defesa vegetal, dentre outros (Cordeiro e Sá, 1999; Pietro *et al.*, 2003).

A diferença básica entre a interação compatível (interação que causa doença no vegetal) e incompatível (aquela que não causa doença) está relacionada à presença ou ausência de um gene de resistência (*R*) na planta e de um gene de avirulência no patógeno (*Avr*) (Flor, 1955; Cordeiro e Sá, 1999; Talarczyk e Hennig, 2001; Nimchuk *et al.*, 2003; Lahaye, 2004). A resistência à doença é usualmente mediada por genes dominantes, embora alguns genes recessivos também atuem no processo de resistência (Buchanan *et al.*, 2000).

De acordo com a hipótese de Flor (1955), numa relação do tipo incompatível, é fundamental que haja interação gene a gene entre a planta e o patógeno para ocorrer ativação rápida do mecanismo de defesa e resistência da planta. Este mecanismo geralmente é específico, o que significa dizer que uma mesma planta pode reconhecer um determinado patógeno A e não reconhecer o patógeno B. Existe especificidade entre diferentes gêneros, espécies, subespécies, cepas e raças de patógenos. Porém, também pode ocorrer que o mesmo produto do gene de resistência reconheça diferentes proteínas de avirulência (Hammond-Kosack e Jones, 1997; Buchanan *et al.*, 2000).

O produto do gene de avirulência (proteína *Avr*) pode interagir com o produto do gene de resistência (proteína *R*) por duas formas principais. Primeiramente, ele

pode interagir diretamente. Em outras situações, esta proteína Avr pode ser modificada pela maquinaria enzimática do hospedeiro e/ou do patógeno e o produto desta modificação é que pode ter o efeito final (Buchanan *et al.*, 2000).

### 1.2.2 - Mecanismo de Defesa Vegetal

Os vegetais desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, um sistema de defesa semelhante àquele encontrado em animais (Taylor, 1998). 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 que poderão gerar uma resposta de defesa (Pascholati e Leite, 1995; Cordeiro e Sá, 1999).

A defesa de plantas inclui mecanismos constitutivos e induzidos. Os constitutivos abrangem as barreiras físicas que se opõem à penetração do patógeno nos tecidos vegetais e os antibióticos ou compostos biostáticos pré-formados. Os mecanismos induzidos envolvem a síntese de novos produtos químicos, como materiais de oposição à entrada do patógeno com atividade antimicrobiana e proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) (van Loon e van Strien, 1999; Iriti e Faoro, 2003).

Uma vez estabelecida a compatibilidade (doença), o patógeno passa a avançar em direção ao interior do tecido do hospedeiro e a comprometer a integridade do mesmo (Pascholati e Leite, 1995; Cordeiro e Sá, 1999).

Na interação incompatível, a ativação dos mecanismos de defesa e resistência propicia à planta imunidade temporária a outros patógenos não relacionados àquele que desencadeou o processo. Esta resistência é denominada resistência sistêmica adquirida (SAR) (Kessmann *et al.*, 1994).

O processo de indução e amplificação da resposta de defesa em plantas é denominado de eliciação. As moléculas que induzem ou amplificam estas respostas são chamadas de elicitores e podem ser de natureza protéica, lipídica, polissacarídica ou outra. O emprego destas moléculas se constitui, atualmente, numa das ferramentas utilizadas para aumentar a resistência de plantas (Cordeiro e Sá, 1999; Buchanan *et al.*, 2000).

A comunicação molecular entre uma dada planta e seu potencial patógeno determina o resultado final desta interação. A entrada direta de moléculas microbianas nos tecidos do hospedeiro e sua subsequente percepção pelos tecidos invadidos determinam a diferença entre suscetibilidade e resistência à doença. Em teoria, algumas moléculas estranhas produzidas pelo patógeno invasor podem atuar como elicitores da resposta de defesa da planta. A diversidade de elicitores reconhecidos pelas plantas parece dar suporte a essa hipótese. A transdução deste reconhecimento requer, provavelmente, regulação da degradação de proteínas e resulta em muitas mudanças na homeostase celular, incluindo morte celular programada (PCD - "Programmed Cell Death"), conhecida em plantas como resposta hipersensitiva, que indica, geralmente, ativação da resposta de resistência à doença (Nimchuk *et al.*, 2003).

#### 1.2.2.1 - Resposta Hipersensitiva (HR)

Sendo um dos mais bem estudados exemplos de PCD em plantas, a resposta hipersensitiva (HR - "Hypersensitive Response") ocorre em oposição à tentativa de invasão da célula vegetal por patógenos. A HR é uma resposta celular extremamente drástica, que resulta na morte repentina de um número limitado de células do hospedeiro, que estão em volta do local da tentativa de infecção. A rápida morte das células do hospedeiro é uma característica marcante de resistência na interação planta-patógeno, sendo um processo geneticamente programado (Pascholati e Leite, 1994; Hüchelhoven *et al.*, 1999; Sasabe *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 2000).

Os aspectos fisiológicos da HR incluem: aumento rápido e transiente de espécies reativas de oxigênio, perda de íons potássio ( $K^+$ ) e ganho de íons hidrogênio ( $H^+$ ) pelas células vegetais, destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula. Além disso, síntese de compostos antimicrobianos como fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa também é um evento que caracteriza este processo (Margis-Pinheiro *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 1999). A HR parece ser dependente da disponibilidade de ácido salicílico (SA - "Salicylic acid) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Hüchelhoven *et al.*, 1999).

A HR é conhecida por privar o patógeno de se alimentar dos nutrientes da planta no início da formação do sítio de infecção, sendo, portanto, bastante eficiente contra uma gama de patógenos biotróficos, ou seja, que se nutrem da matéria viva. Ao contrário, ela não protege a planta contra a infecção por patógenos necrotróficos, como *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Govrin e Levine, 2000). De fato, ao induzirem HR, estes organismos que se nutrem da matéria morta preparam um ambiente extremamente favorável à colonização da planta hospedeira. Paradoxalmente, esse tipo de patógeno se aproveita do mecanismo de defesa da planta para exercer sua patogenicidade (Govrin e Levine, 2000; Mayer *et al.*, 2001).

#### 1.2.2.2 - Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS – “Reactive Oxygen Species”) são produzidas como consequência do metabolismo normal dos tecidos vegetais, mas a infecção por patógeno também pode levar ao estresse oxidativo. Em muitas interações incompatíveis, a produção de ROS é, geralmente, a primeira resposta detectada. As espécies mais típicas de ROS são o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilas ( $HO^*$ ) (Sutherland, 1991; Lamb e Dixon, 1997; Buchanan *et al.*, 2000).

Várias funções são descritas para a participação de ROS na defesa de plantas. Dentre elas, o  $H_2O_2$  pode exercer papel fundamental devido à sua alta mobilidade e reatividade relativamente baixa (van Breuseghem *et al.*, 2001). Peróxido de hidrogênio, além de ser tóxico para o hospedeiro e para o patógeno, está envolvido no fortalecimento da parede celular, aumentando a taxa de polímeros de lignina formados pela atividade da enzima peroxidase (Buchanan *et al.*, 2000).

Peróxido de hidrogênio também atua como mensageiro secundário em diferentes vias de sinalização celular, pela interação com óxido nítrico (NO), ácido salicílico (SA), etileno ( $C_2H_4$ ), ácido jasmônico (JA), assim como induz a transcrição de genes de defesa (Chen *et al.*, 1993; Klessig *et al.*, 2000; Iriti e Faoro, 2003).

O acúmulo de  $H_2O_2$  ou mudanças na sua homeostase são necessários para desencadear uma cascata de transdução de sinais que inicia a HR (Levine *et al.*, 1994; Desikan *et al.*, 1998).

Algumas dessas moléculas (ROS) são altamente tóxicas para o metabolismo celular, como o radical HO\*, por exemplo. Entretanto, os vegetais dispõem de sistemas de defesa antioxidantes para a eliminação dessas moléculas que estão presentes em vários compartimentos subcelulares. Estes sistemas incluem atividades de enzimas antioxidativas, além de sistemas não-enzimáticos de detoxificação destas espécies reativas. O ciclo da ascorbato-glutationa, presente nos plastídios, é a via mais eficiente no processo antioxidativo. Várias enzimas fazem parte desta via catalisando a eliminação de ROS. Radicais superóxidos são eliminados pela superóxido dismutase (SOD) em uma reação que forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e este é, então, consumido através da conversão para oxigênio e água, pela catalase, ou para água através da oxidação, pela ascorbato peroxidase (Buchanan *et al.*, 2000).

As superóxido dismutases (SOD – “Superoxide Dismutase”). (E.C. 1.15.1.1) fazem parte de uma família de metaloenzimas que catalisam a conversão de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a oxigênio molecular e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peixoto, 1998). Nas plantas superiores, coexistem três isoenzimas que são classificadas de acordo com o íon metálico presente no sítio ativo: Cu/ZnSOD, MnSOD e FeSOD (Scandalios, 1993). Essas enzimas estão distribuídas em diferentes compartimentos subcelulares, presumivelmente, devido ao fato do radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> atravessar facilmente as membranas, em razão da sua elevada reatividade (Peixoto, 1998).

As catalases (CAT E.C. 1.11.1.6) são oxidoredutases que ocorrem em formas múltiplas nos tecidos vegetais. São utilizadas em mecanismos enzimáticos primários por organismos aeróbicos para a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Siegel, 1993). As catalases são encontradas em glioxissomos durante a germinação das sementes e, principalmente, em peroxissomos (Cakmak e Horst, 1991; Siegel, 1993).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX E.C. 1.11.1.11) é inerente a uma família de enzimas que eliminam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, às custas de ascorbato, formado durante os processos bioquímicos normais ou durante a imposição de estresses à planta (Burhenne e Gregersen, 2000; Venisse *et al.*, 2002).

A ação conjunta das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase é importante no sistema de defesa da planta contra radicais livres de oxigênio. O aumento da atividade dessas enzimas pode ser considerado uma evidência circunstancial da produção desses radicais (Cakmak e Horst, 1991; Buchanan *et al.*, 2000).

### 1.2.2.3 - Resistência Sistêmica Adquirida (SAR)

Resistência sistêmica adquirida (SAR – “Systemic Acquired Resistance”) é um mecanismo de defesa induzido que tem papel central na resistência de plantas a patógenos (Friedrich *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Anfoka, 2000).

Resistência sistêmica adquirida tem sido observada em várias espécies de plantas como uma consequência da infecção por patógenos. Este tipo de resistência sistêmica envolve a produção de um ou mais sinais de transdução capazes de ativar respostas de resistência em partes não infectadas da planta. O ácido salicílico (SA) é um dos sinais envolvidos na SAR, embora ele não seja o primeiro sinal translocado (Mauch-Mani e Métraux, 1998).

Uma das principais características da SAR é que a invasão do patógeno não é necessária para sua indução. Tratamento de plantas com SA ou seus análogos funcionais como ácido 2,6-cicloroisonicotínico (INA), ácido benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbotiólico S-metil éster (BTH) e ácido  $\beta$ -aminobutírico pode induzir a SAR sem a interação da planta com o patógeno (Cohen *et al.*, 1994; Dong, 1998; Anfoka, 2000). Em todos os casos, a caracterização das mudanças bioquímicas associadas com a indução da resistência revela haver correlação entre o estabelecimento da resistência e o acúmulo do SA (Cohen *et al.*, 1994; Anfoka, 2000).

Vários estudos indicam que o SA é sintetizado pela via do shikimato/arogenato. Após a síntese de fenilalanina por esta via, este aminoácido é convertido em ácido *trans*-cinâmico, o qual pode ser transformado para ácido *ortho*-coumárico ou para ácido benzóico (Sticher *et al.*, 1997).

Tem sido proposto que a SAR pode servir como base para o desenvolvimento de estratégias de controle de doenças. Esse controle incluiria a ativação da maquinaria genética das plantas aumentando assim a resistência através da proteção química (Friedrich *et al.*, 1996). Contudo, a SAR não é efetiva contra todos os patógenos (Vernooij *et al.*, 1995), existindo um espectro definido de patógenos resistentes que servem para distinguir a resposta de SAR de outras respostas de resistência induzida. A SAR é também caracterizada pelo acúmulo coordenado de mRNAs que codificam para um conjunto de genes SAR (Ward *et al.*, 1991). A expressão desse conjunto de genes, que engloba muitos dos genes que codificam para PR-proteínas, também serve como critério para a distinção da SAR de outras

respostas de resistência (Ward *et al.*, 1991; Görlach *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Sparla *et al.* 2004).

Pouco se sabe a respeito dos sinais de transdução do processo que inicia a SAR. O que se acredita é que, em alguns pontos durante a formação de lesões necróticas, um sinal seja liberado e trafegue por toda a planta para provocar a SAR. Este sinal, ainda não conhecido, é percebido em células alvo e então transduzido por uma via de transdução de sinal que é dependente do acúmulo de SA. Seguindo o acúmulo de SA, genes SAR são induzidos e o estabelecimento do estado de resistência é altamente relacionado com a expressão desses genes (Friedrich *et al.*, 1996).

#### 1.2.2.4 - Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-proteínas)

Proteínas relacionadas à patogênese (PR – “Proteins Pathogenesis Related”) foram originalmente observadas, na mesma época, por dois grupos de pesquisa distintos quando trabalhavam com o fumo (*Nicotiana tabacum*) infectado com vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*) (Gianinazzi *et al.*, 1970; van Loon e van Kammen, 1970). As PR-proteínas se acumulam abundantemente nos sítios de infecção, mas algumas também se acumulam em partes não inoculadas de plantas infectadas, embora em menor grau que nas partes inoculadas (Sticher *et al.*, 1997).

As PR-proteínas são definidas como proteínas que são induzidas em processos patogênicos ou situações relacionadas. Elas foram inicialmente divididas em cinco grandes grupos, PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 e PR-5, de acordo com suas características de solubilidade, resistência a proteases, acúmulo em resposta a lesões e mobilidade eletroforética (Carr e Klessing, 1989; Bowles, 1990). Como análogos destas proteínas foram identificados em outras espécies, PR-proteínas adicionais foram agrupadas dentro de 11 (Datta e Muthukrishnan, 1999) e, mais recentemente, 17 famílias (TABELA 1.1) (van Loon *et al.*, 2006).

As PR-Proteínas apresentam algumas características físico-químicas marcantes que, de certa forma, facilitam seu estudo. Dentre estas são destacadas: estabilidade em pHs moderadamente ácidos, predomínio da forma monomérica com massa molecular variando de 8 - 50 kDa, resistência à ação de enzimas proteolíticas e localização em compartimentos ou estruturas celulares definidas (Stintzi *et al.*,

TABELA 1.1 – Famílias de proteínas relacionadas a patogêneses (PR-proteínas)

Família	Membro Tipo	Propriedades
PR-1	Tabaco PR-1	Antifúngica, anti-oomicetos
PR-2	Tabaco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinase tipos I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tabaco R	Quitinase tipo I, II
PR-5	Tabaco S	Semelhante à Thaumatina
PR-6	Tomate	Inibidor de protease
PR-7	Tomate P <sub>69</sub>	Endoproteinase
PR-8	Pepino	Quitinase tipo III
PR-9	Tabaco	Peroxidase
PR-10	Salsa PR-1	Semelhante à Ribonuclease
PR-11	Quitinase V de tabaco	Quitinase tipo I
PR-12	Defensinas	Antifúngica
PR-13	Tioninas	Antifúngica
PR-14	LTP4 de cevada	Proteína de transferência de lipídios
PR-15	OxOa de cevada	Oxalato oxidase
PR-16	OxOLP de cevada	Semelhante à Oxalato oxidase
PR-17	PRp27 de fumo	Desconhecida

Fonte: van Loon *et al.*, 2006.

1993). Algumas destas PR-Proteínas são encontradas nas plantas como isoenzimas ou isoformas, apresentando, entre si, certas características físico-químicas diferentes, particularmente em relação ao caráter aniônico ou catiônico (Urbanek *et al.*, 1991, Mellon, 1991, Fernandes *et al.*, 2006).

A indução dessas proteínas pode ocorrer, também, após o contato da planta com elicitores bióticos, substâncias químicas sintéticas e fitohormônios. Estresses mecânicos e fatores climáticos também são capazes de induzir a atividade dessas proteínas, sugerindo um papel fisiológico de defesa na planta (Urbanek *et al.*, 1991; Ham *et al.*, 1991; Mauch *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1993; Cipollini, 1998; Lee e Lee, 2000; Jan *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2001; Akiyama e Pillai, 2001; Martins-Miranda, 2002). Entretanto, o mecanismo de ativação dessa resposta de defesa parece ser diferente quando comparado com a resposta de defesa induzida pelos elicitores bióticos (Ham *et al.*, 1991).

As PR-proteínas incluem enzimas hidrolíticas que modificam a parede celular de hospedeiros, como as quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, proteínas com funções antimicrobianas (Mee Do *et al.*, 2004) e proteínas que participam na lignificação da parede celular de plantas em resposta ao ataque de patógenos, como as peroxidases (Cipollini, 1998), além de outras.

As quitinases (CHI E.C.3.2.1.14) e as  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU E.C. 3.2.1.6) são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de *N*-acetilglucosamina) e os  $\beta$ -1,3-glucanos (polímeros lineares de glucose unidos por ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), respectivamente. Essas hidrolases ocorrem em vários órgãos vegetais e podem estar envolvidas na defesa contra microrganismos que apresentam esses dois tipos de polímeros como componentes estruturais fundamentais de sua parede celular, como a maioria dos fungos fitopatogênicos e bactérias e, ainda, contra nematóides que apresentam a parede do corpo revestida por quitina. Além disso, efeito destas enzimas sobre a membrana peritrofica (constituída de quitina) de insetos também tem sido investigado (Sticher *et al.*, 1997).

Peroxidases (POX E.C. 1.11.1.7) são encontradas em microrganismos, plantas e animais (Doerge *et al.*, 1997). As peroxidases vegetais envolvidas na defesa comumente classificadas como PR-proteínas compreendem uma classe de enzimas que participam na lignificação da parede celular em resposta ao ataque de microrganismos ou injúrias físicas. Essas enzimas diferem das peroxidases

relacionadas à remoção de ROS por utilizarem como aceptores de elétrons compostos fenólicos, como o guaiacol, por exemplo. Oxidação de produtos fenólicos e participação no catabolismo de auxinas são outras funções atribuídas a esta classe de peroxidases (Cipollini, 1998).

#### 1.2.2.5 - Lignificação

Lignina é um biopolímero complexo que tem sua origem na chamada via dos fenilpropanóides pela polimerização desidrogenativa de precursores. A ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) é fundamental no processo de lignificação, uma vez que ela promove a desaminação da fenilalanina originando, além do ácido *trans*-cinâmico, outros precursores intermediários da síntese de lignina (Vance *et al.*, 1980). Além disso, enzimas como a cinamil álcool desidrogenase (CAD) e peroxidases (POX) também estão envolvidas no processo (Stadnik e Buchenauer, 2000).

A deposição de lignina se dá principalmente na parede celular secundária, promovendo rigidez e estrutura de apoio para polissacarídeos da parede (Sarkanen e Hergert, 1971).

O fenômeno de lignificação é uma das várias repostas de defesa em plantas a ferimentos e a invasão por patógenos (Vance *et al.*, 1980; Agrios, 2005). Através da lignificação, a parede celular torna-se mais resistente à entrada de patógenos, o que pode bloquear ou dificultar o acesso do invasor ao conteúdo celular. Evidências de que a lignificação constitui importante mecanismo de defesa, sendo considerada uma das características de SAR, são acumuladas (Vance *et al.*, 1980; Busam *et al.*, 1997).

A lignificação pode ser induzida pela presença de fungos e está freqüentemente limitada a poucas células no sítio de infecção (Stadnik e Buchenauer, 2000). A estrutura da lignina induzida não está bem caracterizada, mas parece diferir da constitutiva (Robersten e Svalheim, 1990). Aumento na lignificação tem sido observado em plantas resistentes. Isso faz com que esse processo assuma importante papel na defesa vegetal (Stadnik e Buchenauer, 2000).

Embora seja conhecido que a síntese de lignina é uma resposta de resistência da planta, a qual pode ser induzida por agentes bióticos e abióticos,

possuindo caráter de sistemicidade e, ainda, está intrinsecamente associada a SAR, os mecanismos de indução e síntese deste biopolímero ainda não estão totalmente esclarecidos.

#### 1.2.2.6 - Fenilalanina Amônia Liase (PAL)

A enzima Fenilalanina Amônia Liase (PAL – “Phenylalanine Ammonia-Lyase”) (E.C. 4.3.1.5) apresenta importante papel no processo de lignificação por converter fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico que, além de ser intermediário chave no caminho para produção de lignina é também importante precursor da síntese de SA. Dependendo da espécie de planta, a PAL pode ter papel na resistência localizada ou na resistência sistêmica adquirida (Ryals *et al.*, 1996).

A atividade da PAL parece estar relacionada à síntese de fenóis em resposta à infecção por patógenos (Nicholson e Hammerschmidt, 1992).

Segundo Mauch-Mani e Slusarenko (1996) e Carver *et al.* (1994), a utilização de inibidores específicos de PAL reduz a resistência de plantas a doenças, talvez pelo impedimento da síntese dos derivados fenilpropanóides necessários à formação de lignina.

#### 1.2.3 – Indução de Resistência em Plantas

As plantas possuem alguns mecanismos de defesa que, aparentemente, permanecem inativos ou latentes, só sendo acionados ou ativados, após serem expostas e, ou, entrarem em contato com agentes de indução. Nesse caso, a resistência é dita induzida (Agrios, 2005). Esse processo de indução de resistência em plantas a patógenos é conhecido desde o século XX (Chester, 1933).

Os estudos da interação planta-patógeno têm demonstrado que o simples contato da planta com seu agressor ativa uma cascata de eventos, como a HR, SAR, explosão oxidativa dentre outros, que pode levar à resistência. Além do contato com patógenos, as plantas podem ter seu mecanismo de defesa ativado por outros tipos de compostos, estes chamados de indutores de resistência ou simplesmente

elicitores. Os indutores de resistência em plantas podem ser de origem biótica ou abiótica ou, ainda, endógena ou exógena (Romeiro, 2002).

O ácido salicílico (SA) possui importante papel nas vias de sinalização que levam à indução de resistência. Em decorrência do processo de infecção, os níveis endógenos de SA podem aumentar de forma local e, ou sistêmica nos tecidos vegetais, conferindo, assim, resistência (Heil e Bostock, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que a aplicação exógena de SA também pode sinalizar para ativação dos mecanismos de defesa de plantas (Du e Klessig, 1997).

Estes resultados levaram ao desenvolvimento de pesquisas visando a descoberta e utilização de compostos com potencial para induzir as repostas de defesa. Dentre esses compostos, são constantes as pesquisas com o ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico s-metil éster (BTH), análogo do SA, ácido jasmônico e seus derivados, sisteminas, etileno, quitosana, oligossacarídeos, glicoproteínas, dentre outros (Neuenschwander *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1996; Hunt *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 2000; Cavalcanti, 2005).

Quando as plantas, após terem sido expostas a indutores de resistência, são protegidas contra patógenos, não se pode afirmar que ocorreu indução de resistência, afinal, o elicitor tanto pode estar realmente induzindo resistência como atuando diretamente sobre o patógeno ou até fazendo as duas coisas ao mesmo tempo (van Loon *et al.*, 1998).

Critérios básicos foram propostos para se investigar se a resistência apresentada pela planta foi realmente induzida ou se ela se deve a outros fatores que, de alguma forma, contribuíram para reduzir a infecção e, ou, severidade da doença. Esses critérios foram sugeridos por Kessmann *et al.* (1994), Steiner e Schönbeck (2002) e, mais recentemente, revisado por Romeiro (2002).

- i) Tanto o composto indutor como seus metabólitos não devem apresentar atividade antimicrobiana.
- ii) Caso exista o bloqueio dos genes que são ativados pelo indutor a resistência deverá ser suprimida, visto que a resistência induzida é codificada por genes do hospedeiro que precisam ser ativados, direta ou indiretamente pelo indutor, para que ela se expresse.
- iii) Necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência (van Loon *et al.*, 1998), levando em consideração que a

expressão da SAR pode demorar de alguns dias a uma semana (Hammerschmidt e Kuc 2002).

iv) Ausência da relação entre amplitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado. Mas é conhecido que, há necessidade de uma quantidade mínima de elicitor para haver indução, porém, uma vez expressa essa resistência, aumentos da quantidade do indutor não correspondem a um aumento da resistência (van Loon *et al.*, 1998).

v) O composto elicitor deve ser capaz de induzir resistência contra uma gama de patógenos.

vi) A resistência deve ser local e sistêmica.

vii) Ser dependente do genótipo da planta.

Algumas substâncias químicas, e alguns mecanismos a elas associados, podem ser interpretados como sinais biológicos, que levariam à resistência (Reddy *et al.*, 2000). Esses ativadores químicos de defesa de plantas começam a constituir uma nova classe de pesticidas (Kunz *et al.*, 1997) e estão sendo chamados de “fungicidas de quarta geração” por terem um modo de atuação completamente diferente dos defensivos até agora desenvolvidos, uma vez que não apresentam efeito direto sobre patógenos, mas tornam as plantas resistentes por ativarem seus mecanismos de defesa (Romeiro, 2002).

O uso da técnica de indução de resistência é bastante interessante quando comparado à aplicação de pesticidas, pois, na maioria dos casos, a indução de resistência é mediada por compostos que apresentam alta eficiência e baixa toxicidade ao meio ambiente e aos seres humanos. De modo diferente, o uso continuado e excessivo de defensivos é perigoso, uma vez que grande parte deles apresenta potencial carcinogênico e toxicidade residual, além do desenvolvimento de populações de patógenos resistentes ao emprego destes compostos (Romeiro 2002).

#### 1.2.4 – Ácido (1,2,3)-Benzotiazol-7-Carbotióico S-metil Éster (BTH), como Indutor de Resistência

Tem sido proposto que para um composto ser determinado como ativador químico de SAR, ele deve apresentar três características principais: i) apresentar a

capacidade de induzir resistência contra uma ampla gama de patógenos; ii) o composto nem seus metabólitos devem apresentar atividade antimicrobiana e iii) tratamento químico mostra a capacidade de induzir a expressão de alguns marcadores bioquímicos do modelo biológico (Kessmann *et al.*, 1994).

O ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico s-metil éster (BTH – “benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid (S) methyl éster”) é um produto químico que apresenta as três características descritas acima e é conhecido por ativar genes responsáveis pela indução de SAR (Sparla *et al.*, 2004), PR-proteínas e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina (Reglinski *et al.*, 1997). Ele recebe particular atenção por possuir baixa toxicidade para plantas, animais e para o meio ambiente e, ainda, alta eficiência na proteção de numerosas espécies de plantas contra uma variedade de patógenos (TABELA 1.2) (Iriti e Faoro, 2003).

Investigações histoquímicas e citoquímicas mostraram que o BTH causa acúmulo de  $H_2O_2$  em tecidos tratados. Contudo, nenhuma morte celular foi detectada em concentrações de BTH abaixo da concentração mínima capaz de causar fitotoxicidade, sugerindo que a resistência adquirida está relacionada, principalmente, ao aumento na atividade de peroxidases aniônicas promovido pela acúmulo de  $H_2O_2$ , talvez, iniciando assim, o processo de fortalecimento da parede celular da planta (Iriti e Faoro, 2003).

Este produto induz resistência sistêmica em trigo cv. Monopol, susceptível ao fungo *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, diminuindo a eficiência de penetração do fungo (Görlach *et al.*, 1996). Aumento nas atividades das enzimas PAL e peroxidase em plantas de trigo tratadas com BTH, quando comparadas com plantas controles não tratadas, também foi observado. Lignina e compostos fenólicos ligados à parede celular também apresentaram maiores níveis de concentração nas plantas tratadas que em plantas controle. Os resultados sugerem que compostos da via dos fenilpropanóides são mais rapidamente sintetizados em resposta ao ataque do patógeno em plantas tratadas com BTH. Portanto, nesse caso, um acúmulo rápido de compostos fenólicos no sítio de penetração do fungo pode estar envolvido na resistência induzida por BTH (Stadnik e Buchenauer, 2000).

TABELA 1.2 – Interações planta-patógeno nas quais o BTH induz resistência

Hospedeiro	Patógeno	Referência
Algodão	<i>Alternaria macrospora</i>	Colson-Hanks e Deverall. (2000)
<i>Arabidopsis</i>	Vários	Lawton <i>et al.</i> (1996)
Arroz	<i>Pseudomonas syringae</i>	Scheweizer <i>et al.</i> (1999)
Beterraba	<i>Cercospora beticola</i>	Burketová <i>et al.</i> (1999)
<i>Brassica</i>	<i>Peronospora parasitica</i> e <i>Rhizoctonia solani</i>	Jensen <i>et al.</i> (1998)
Cana-de-açúcar	<i>Colletotrichum falcatum</i>	Ramesh Sundar <i>et al.</i> (2001)
Cevada	<i>Blumeria graminis</i>	Kogel e Hüchelhoven (1999)
Couve flor	<i>Peronospora parasitica</i>	Godard <i>et al.</i> (1999)
Ervilha	<i>Mycosphaerella pinodes</i> e <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	Dann e Deverall (2000)
Feijão	Vários	Siegrist <i>et al.</i> (1997)
Feijão-de-corda	<i>Colletotrichum destructivum</i>	Latunde-Dada e Lucas (2001)
Girassol	<i>Orobanche cumana</i>	Sauerborne <i>et al.</i> (2002)
Milho	Vários	Morris <i>et al.</i> (1998)
Pepino	<i>Pythium ultimum</i>	Benhamou e Bélanger (1998)
Pêra	Vários	Ishii <i>et al.</i> (1999)
Rosa	<i>Diplocarpon rosae</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Suo e Leung (2001)
Tabaco	Vários	Friedrich <i>et al.</i> (1996)
Tomate	Cucumber mosaic virus	Anfoka (2000)
Trigo	Vários	Görlach <i>et al.</i> (1996)

Fonte: Iriti e Faoro (2003), com modificações.

O BTH também está relacionado com a indução de resistência em plantas a doenças causadas por vírus. A aplicação de BTH em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Vollendung), sete dias antes da inoculação com *Cucumber mosaic vírus* (CMV-Y), protegeu a planta contra as necroses causadas pelo vírus (Anfoka, 2000).

O BTH gera proteção semelhante ao SA, composto conhecido por estar fisiologicamente implicado no início da SAR (Sparla *et al.* 2004). Os dois compostos inibem a ação das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) aumentando assim, a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos tratados e, conseqüentemente, aumentando a atividade da enzima peroxidase (POX), envolvida no fortalecimento da parede celular. A aplicação de BTH não causa acúmulo de SA em tabaco (Friedrich *et al.*, 1996).

O recente desenvolvimento do primeiro indutor de resistência disponível comercialmente é um considerável avanço entre a integração da SAR e o programa de controle de doenças de plantas (Anfoka, 2000). O BION<sup>®</sup> 500 WG, nome comercial do BTH dado pela empresa Italiana Syngenta, é um ativador de plantas e não tem ação direta contra os patógenos. Aplicado na parte aérea das plantas, ativa os seus próprios mecanismos naturais de defesa e aumenta sua resistência às doenças. Devido ao seu modo de ação, o produto deve ser aplicado antes da entrada dos patógenos, de forma preventiva. O produto é rapidamente absorvido pelos tecidos foliares e se transloca, sistemicamente, tanto para as folhas quanto para as raízes, ativando, assim, a planta de forma generalizada (Syngenta, 2007).

Quando aplicado segundo as recomendações, o produto pode ser utilizado sem risco de fitotoxicidade. Estudos realizados em animais de laboratório, com administração de BTH por via oral, mostraram que cerca de 90% do produto ingerido é rapidamente absorvido pelo trato gastrintestinal, prontamente metabolizado e excretado (Syngenta, 2007).

Em 1933, Chester tinha reconhecido o potencial impacto na agricultura que podia resultar da manipulação de plantas e seu inerente sistema "imune". Devido seu amplo aspecto sistêmico e as características de resistência da SAR, a indução de resistência tem sido sugerida como a base do controle de doenças (Kuc, 1982; Ryals *et al.*, 1994). Plantas diversas como tabaco, tomate, pepino, trigo, arroz, dentre outras, tratadas com BTH, foram protegidas de várias doenças e não apresentaram efeitos negativos na produção. Dessa forma, o tratamento com BTH é,

atualmente, considerado uma nova tecnologia no controle de doenças (Friedrich *et al.*, 1996). Contudo, sua aplicação em outras culturas deve ser alvo de estudos.

#### 1.2.5 – Feijão-de-corda

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] é uma das mais antigas culturas conhecidas pelo homem. Sua origem e subsequente domesticação estão associadas com milheto (*Pennisetum glaucum*), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), milho (*Zea mays* L.), mandioca (*Manihot esculenta*) e algodão (*Gossypium barbadense* L.) na África (Ehlers e Hall, 1997; Quinn e Myers, 2002; Imrie, 2002; Valenzuela e Smith, 2002).

A área de cultivo mundial do feijão-de-corda é de, aproximadamente, 8.094.000 ha (Quinn e Myers, 2002), com produção excedendo aos 2 milhões de toneladas. Entretanto, somente uma pequena porção desse montante entra no comércio internacional (Imrie, 2002). Esta cultura é largamente produzida na África, predominando na região da Nigéria, mas o Brasil, Haiti, Índia, Austrália, Estados Unidos e Bósnia também apresentam produção significativa (Ehlers e Hall, 1997; Quinn e Myers, 2002; Imrie, 2002). Esta leguminosa tem sido cultivada também em algumas regiões do sul da Europa (Itália) e várias técnicas estão sendo estudadas para introduzir esta cultura no sudeste da Europa (Ehlers e Hall, 1997).

Comestível e dotado de alto conteúdo protéico, rico em minerais (cálcio e ferro) e vitaminas (Sales, 1988; van Le *et al.*, 2002), o feijão-de-corda possui boa capacidade de fixação de nitrogênio, sendo ainda pouco exigente em fertilidade e adaptado a altas temperaturas (20-35°C) (Araújo e Watt, 1988; Ehlers e Hall, 1997; Valenzuela e Smith, 2002). A cultura cresce bem em vários tipos de textura de solos, em solos variando de ligeiramente ácidos a ligeiramente alcalinos (pH 5.5-8.3), em extremos de umidade e se estabelece facilmente em condições de escassez de água (Valenzuela e Smith, 2002).

As regiões Norte e Nordeste são consideradas as áreas de maior produção e o Estado do Ceará o maior produtor nacional, sendo responsável por cerca de 20% da produção (IBGE, 2003).

No cenário da produção agrícola nordestina, dadas as freqüentes ocorrências de insuficiência pluviométrica, o feijão, pelas suas características de ciclo curto e

tolerância ao estresse hídrico, maior que muitas outras culturas comumente cultivadas na região, ocupa especial relevância no suprimento alimentar e na composição da renda familiar (Frota e Pereira, 2000).

Amplamente cultivado por pequenos produtores das regiões mais pobres do Brasil, tem sido crescente a sua comercialização, apesar da baixa produtividade alcançada. Devido às suas qualidades nutricionais e ao baixo custo de produção, justificam-se os esforços para incrementar a produtividade, comercialização e difusão desta cultura nas regiões do país onde se encontra uma população com sérias carências alimentares (Cardoso, 2000).

As doenças do feijão-de-corda têm causado perdas expressivas no processo de produção, sendo um dos principais fatores limitantes do cultivo racional da cultura. Doenças que infectam o feijão-de-corda determinam perdas tanto no volume de produção quanto na qualidade do produto. Dentre os organismos patogênicos, os vírus e os fungos são destacados como os mais importantes. Os nematóides e as bactérias, apesar de estarem em um nível inferior de importância, têm respondido, em certas situações e locais, por danos significativos (Sobrinho *et al.*, 2000).

Resistência a vírus é um dos mais importantes objetivos dos programas de melhoramento no Brasil, África e partes do Sul dos Estados Unidos. Importantes viroses do feijão-de-corda incluem CABMV (*Cowpea aphid-borne mosaic virus*), BICMV (*Blackeye cowpea mosaic virus*), CMV (*Cucumber mosaic cucumovirus*), CSMV (*cowpea severe mosaic comovirus*), SBMV (*southern bean mosaic virus*), CPMoV (*Cowpea mottle virus*), CGMV (*Cowpea golden mosaic geminivirus*) e CCMV (*Cowpea chlorotic mottle virus*). Cultivares com resistência para várias viroses têm sido desenvolvidas no IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical) (Ehlers e Hall, 1997).

Com relação ao grupo dos fungos, existe atualmente grande número de relatos de fungos fitopatogênicos em feijão-caupi. Dentre o grupo de doenças causadas por fungos com grande impacto econômico, é possível destacar: a mancha de corynespora (*Corynespora cassiicola*), a mancha de septoria (*Septoria vignae*), a ferrugem rosada (*Phakospora pachyrhizi*), a mancha dactuliophora (*Dactuliophora tarii*), a mancha de cercospora ou cercosporiose (*Cercospora cruenta* e *C. canescens*), a podridão do colo (*Phythium aphanidermatum*), a mela ou murcha da teia micélica (*Rhizoctonia solani*), a sarna (*Sphaceloma* sp.), a ascochyta (*Ascochyta phaseolorum*), o carvão (*Entyloma vignae*), a ferrugem (*Uromyces*

*vignae*), a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum*) (Rios, 1988; Ehlers e Hall, 1997; Sobrinho *et al.*, 2000).

As doenças bacterianas do feijão-de-corda ocorrem de forma generalizada no Brasil, mas não ocupam lugar de destaque entre os principais fatores limitantes da produtividade desta leguminosa. Apenas três grupos de doenças bacterianas são mais disseminados: a mancha bacteriana (*Xanthomonas vignicola*); a pústula bacteriana (*Xanthomonas sp.*) e o fogo-selvagem (*Pseudomonas syringae pv. tabaci*) (Rios, 1988).

Apesar de ser grande o número de espécies de fitonematóides descritas e associadas ao feijão-de-corda no Brasil, poucas têm se mostrado como importantes parasitas. Entretanto, os nematóides formadores de galhas radiculares (*Meloidogyne spp.*) e os das lesões radiculares (*Pratylenchus spp.*) (Silva, 2000) são os que mais se destacam.

Além de todas as pragas presentes nas áreas de cultivo do feijão-de-corda, esta cultura enfrenta também sérios problemas quanto à sua conservação em armazéns. A principal ordem de insetos, envolvida na contaminação dos grãos armazenados é a Coleoptera, sendo todas as espécies pertencentes à família Bruchidae. Dentre estas espécies, *Callosobruchus maculatus* se constitui na principal praga do feijão-de-corda armazenado (Santos *et al.*, 1977; Baker *et al.*, 1989).

O Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) e o Instituto de Pesquisas Agrícolas do Senegal (ISRA) estabelecem técnicas para aumentar a produção de feijão-de-corda e desenvolvem cultivares resistentes aos vários patógenos (Ehlers e Hall, 1997).

Esta cultura é relativamente pouco explorada quando comparada com outras leguminosas populares e um grande aumento na produtividade pode ser alcançado. Recentes contribuições dedicadas por cientistas de várias partes do mundo vêm aumentando o entendimento do feijão-de-corda, particularmente nas áreas da fisiologia do estresse, recursos genéticos, resistência a doenças causadas por fungos, insetos, ervas daninhas e nematóides (Ehlers e Hall, 1997).

### 1.2.6 – Nematóides das Galhas

Os nematóides são organismos pertencentes ao filo Nematoda e constituem o grupo com maior número de espécimes dentre os animais multicelulares (Yeates *et al.*, 1993). Em número de espécies, os nematóides ocupam o segundo lugar, ficando atrás apenas dos insetos (Ferris *et al.*, 2001). Estima-se que o número de espécies de nematóides seja de aproximadamente um milhão, muitas das quais são de vida livre existindo, também, nematóides parasitas de plantas e de animais (Guerena, 2006).

Embora as espécies parasitas de plantas, fitoparasitas, representem a minoria dentro do filo Nematoda, essas causam perdas de mais de 100 bilhões de dólares por ano na produção agrícola mundial (Sasser e Freckman, 1987).

Os nematóides das galhas, gênero *Meloidogyne*, constituem o principal grupo de nematóides fitoparasitas de importância econômica. Suas espécies estão amplamente distribuídas e atacam quase todas as plantas cultivadas, causando perdas consideráveis na produção e na qualidade dos produtos. Apesar das poucas informações disponíveis com relação às perdas causadas pelos nematóides das galhas, estima-se que no Brasil esses nematóides reduzam em aproximadamente 8, 9, 11, 15, 15, 17, 23, 24 e 25% a produção de banana, cana-de-açúcar, feijão-comum, mamão, inhame, algodão, soja, café e tomate respectivamente (Ferraz, 1985).

Das mais de 80 espécies descritas de nematóides das galhas (Carneiro *et al.*, 2000), *Meloidogyne incognita* é considerada a mais prejudicial à agricultura, pois além da sua agressividade, possui algumas características que dificultam seu controle, como ampla gama de hospedeiras (Roberts, 1995), alta persistência no solo na ausência de plantas hospedeiras (Rebel *et al.*, 1976), existência de raças fisiológicas (Hartman e Sasser, 1985) e uma grande distribuição geográfica, causando prejuízos em áreas localizadas entre as latitudes 40 °N e 33 °S, nas mais variadas condições ambientais (Taylor *et al.*, 1982).

Os nematóides das galhas, endoparasitas sedentários que dependem de citoplasma vivo para sua sobrevivência, são eficientemente preparados para localizar a planta hospedeira e estabelecer uma relação parasítica. Para isso, esses fitonematóides dispõem de um sistema nervoso bem desenvolvido, estruturas especiais como estilete e glândulas esofagianas que possibilitam uma eficiente

penetração na planta e modificação da célula hospedeira para retirada de nutrientes (Hussey *et al.*, 2002).

O sucesso do parasitismo depende do eficiente progresso das várias fases ocorridas durante a interação nematóide-planta. Uma das fases iniciais é a atração que a planta exerce sobre o nematóide, decorrente da presença de compostos orgânicos produzidos e liberados pelas raízes (Zhao *et al.*, 2000). As fases seguintes envolvem o reconhecimento e penetração do nematóide na planta, movimentação pela região cortical e estabelecimento do sítio de alimentação, onde o nematóide permanece até atingir a maturidade e a reprodução (Abad *et al.*, 2003)

A atração e reconhecimento acontecem em resposta aos sinais emitidos pelas raízes, na forma de compostos orgânicos como exsudatos, secreções e mucilagens, perceptíveis aos órgãos sensoriais dos fitonematóides como os anfídeos e as papilas labiais. Na região meristemática das raízes e nos locais onde emergem as raízes laterais ocorrem maior exsudação dessas substâncias, fato que explica a maior penetração de nematóides das galhas nesses pontos (Zhao *et al.*, 2000).

Após o direcionamento do nematóide para a raiz, em resposta aos sinais químicos emitidos pela planta na forma de exsudatos, a fase infectiva de *Meloidogyne*, os juvenis de segundo estágio (J2), iniciam o processo de infecção na planta hospedeira. Os J2 utilizam o estilete para penetrar a parede celular, injetar secreções na célula hospedeira e retirar nutrientes do citoplasma. A parede celular vegetal constitui a primeira barreira encontrada pelos J2, que tem que ser ultrapassada para o estabelecimento da relação parasítica. Além da força mecânica exercida pelo estilete durante seu contínuo movimento para o interior da célula, os J2 secretam enzimas hidrolíticas para degradação dessa parede (Davis *et al.*, 2004).

Ultrapassada a epiderme, os J2 migram intercelularmente pela região cortical em direção ao cilindro vascular. Para facilitar sua migração, esses nematóides secretam enzimas que degradam os constituintes da lamela média. Ao atingirem o cilindro vascular, os J2 induzem a rediferenciação das células das raízes da planta hospedeira, as quais formarão os sítios de alimentação, que consistem de várias células gigantes originárias da rediferenciação de células parenquimáticas do cilindro vascular (Wyss *et al.*, 1992). As células gigantes são essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos nematóides do gênero *Meloidogyne* (Williamson e Hussey, 1996).

A formação de células gigantes é o resultado da ativação de genes da planta e da reativação do ciclo celular, induzida por secreções do nematóide (Williamson e Hussey, 1996). Essas células sofrem sucessivas divisões nucleares sem ocorrência de citocinese, tornando-se multinucleadas. O citoplasma dessas células torna-se denso, com grande número de mitocôndrias, e as paredes celulares tornam-se invaginadas, aumentando a superfície de absorção de fotoassimilados, minerais e outros metabólitos. Tanto a indução, quanto a manutenção das células gigantes, dependem do contínuo estímulo do nematóide, sem o qual essas células atrofiam e degeneram (Reddigari *et al.*, 1985). Ao redor dos sítios de alimentação ocorre a divisão de células corticais, dando origem às típicas galhas induzidas por *Meloidogyne* spp. (Williamson e Hussey, 1996).

Após o estabelecimento do sítio de alimentação, os J2 de nematóides das galhas se tornam sedentários e iniciam seu desenvolvimento pós-infectivo. Passam por três ecdises e atingem a fase adulta. As fêmeas desses nematóides são globosas e permanecem no tecido vegetal, enquanto os machos possuem formato vermiforme, recuperam a mobilidade e deixam a raiz (Herman *et al.*, 1991).

A reprodução do nematóide começa após 21 a 42 dias da infecção, variando de acordo com a espécie de *Meloidogyne*, da planta hospedeira e das condições ambientais (Reddigari *et al.*, 1985). Durante o período de ovoposição, as fêmeas iniciam a secreção de uma substância mucilaginosa que é eliminada pelas glândulas retais, a qual envolverá e protegerá os ovos que serão ali depositados. Cada fêmea produz em média 500 ovos, mas há relato de fêmeas que produziram até 2.850 ovos. Com a eclosão de novos juvenis, que vão infectar a mesma ou outra planta, o ciclo de vida do nematóide é reiniciado (Grundler e Böckenhoff, 2002).

### 1.3 – CONCLUSÃO

O controle do ataque de plantas por patógenos sejam estes fungos, bactérias, vírus ou nematóides, pode ser conseguido pelo estímulo apropriado de mecanismos de resistência de plantas a doenças. A estratégia de indução de resistência em plantas está sendo vista como componente indispensável em medidas de controle de enfermidades nas culturas agrícolas. O uso dessa técnica chama a atenção pela eficiência e baixa agressão ao meio ambiente e à saúde de seres humanos.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas para demonstrar a capacidade de compostos em induzir respostas de defesa em plantas. Entretanto, análises provenientes das interações específicas entre plantas e patógenos ainda estão por ser realizadas. Assim, são necessárias constantes pesquisas sobre a resistência natural de plantas, economicamente importantes, a patógenos que causam grandes danos à produção.

#### 1.4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P., FAVERY, B., MARIE-NOELLE, R., CASTAGNONE-SERENO, P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Molecular Plant Pathology** 4(4), 217-224.

AGRIOS, G. N. (2005). **Plant Pathology** 5ª Edição. San Diego-USA, Elsevier Academic Press.

AKIYAMA, T., PILLAI, M.A. (2001). Molecular cloning, characterization and in vitro expression of a novel endo- $\beta$ -glucanase up-regulated by ABA and drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, 161, 1089-1098.

ANFOKA, G.H. (2000). Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl éster induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, 19, 401-405.

ARAÚJO, J.P.P., WATT, E.E. (1988). O caupi no Brasil. **IITA/EMBRAPA**. Brasília-DF, p.722.

BAKER, T.A., NIELSEN, S. S., SHADE, R. E., SINGH, B. B. (1989). Physical and chemical attributes of cowpea lines resistant and susceptible to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, 25, 1-8.

BOWLES, D.J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, 59, 873-907.

BUCHANAN, M., GRUSSEM, W., JONES, R. (2000). **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**. Editora American Society of Plant Physiologists. Rockville USA, 1367p.

BURHENNE, K., GREGERSEN, P.L. (2000). Up-regulation of the ascorbate-dependent antioxidative system in barley leaves during powdery mildew infection. **Molecular Plant Pathology**. 1 (5), 303-314.

BUSAM, G., KASSEMAYER, H.H., MATERN, U. (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology** 115, 1029-1038.

CAKMAK, I., HORST, J.H. (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiology Plantarum**, Copenhagen 83, 463-468.

CARDOSO, B. B. (2000). Fixação biológica de nitrogênio em plantas de feijão-de-corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. na presença de diferentes níveis de salinidade. **Tese de Doutorado**. Fortaleza, UFC.

CARNEIRO, R.M.D.G., Almeida, M.R.A., Quénéhervé, P. (2000). Enzyme phenotypes of Meloidogyne spp. populations. **Nematology** 2(6), 645-654.

CARR, J.P., KLESSING, D.F. (1989). The pathogenesis-related proteins of plants. In: SETLOW, J.K. (ed.). **Genetic Engineering Principles and Methods**. New York, Plenum Press, 11, 65-109.

CARVER, T.L. W., ZEYEN, R.J., BUSHNELL, W.R., ROBBINS, M.P. (1994). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase increases quantitative susceptibility of barley to powdery mildew (*Erysiphe graminis* D.C.). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 44, 261-272.

CAVALCANTI, F.R. (2005). Resistência induzida a *Xanthomonas versicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: Caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos. **Tese de Doutorado**. Departamento de Fitopatologia, UFLA, Lavras-MG.

CHEN, Z., SILVA, H., KLESSIG D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science** 262, 1883-1886.

CHÉSTER, K.S. (1933). The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quartely Review of Biology** 8, 275-324.

CIPOLLINI, D.F. Jr. (1998). The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical. **American Journal of Botany** 85 (11), 1586-1591.

COHEN, Y., NIDERMAN, T., MOSINGER, E., FLUHR, R. (1994).  $\beta$ -aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology** 104, 59-66.

CORDEIRO, M.C.R. e SÁ, M.F.G., (1999). Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia** Vol 10.

DATTA, S.K., MUTHUKRISHNAN, S. (1999) **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida.

DAVIS, E.L., HUSSEY, R., BAUM, T. (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology** 20(3), 134-141.

DESIKAN, R., REYNOLDS, A., ANCOCK, J.T., NEILL S.J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochemistry Journal** 330, 115-120.

DÍAZ, J., BERNAL, A., POMAR, F., MERINO, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedling in response to copper stress and its relation to lignification. **Plant Science** 161, 179-188.

DOERGE, D.R., DIVI, R.L., CHUCHWELL, M.I. (1997). Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry** 250, 10-17.

DONG, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 1, 316-323.

DU, H., Klessig, D.F. (1997). **Identification of a Soluble, High-Affinity Salicylic Acid-Binding Protein in Tobacco.** **Plant Physiology** 113, 1319-1327.

EHLERS, J. D., HALL, A. E., (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research** 53, 187-204.

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

FERRAZ, S. (1985). Summary report on the current status, progress and needs for Meloidogyne research in Brazil: Region III. *In*: Sasser, J.N., Carter, C.C. (Eds.). **An Advanced Treatise on Meloidogyne.** North Carolina: North Carolina State University. pp. 351-352.

FERRIS, H., BONGERS, T., GOEDE, R.G.M. (2001). A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. **Applied Soil Ecology** 18, 13-39.

FLOR, H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phytopathology** 45, 680-685.

FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUTRELLA M., MEIER B., DINCHER S., STAUB T., UKNES S., METRAUX J. P., KESSMANN H., RYALS, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal** 10(1), 61-70.

FROTA, A.B., PEREIRA, P.R. (2000). Caracterização da produção de feijão caupi na região meio-norte do Brasil. *In*: Embrapa Meio-Norte. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Terezina, 241p.

GIANINAZZI, S., MARTIN, C., VALLÉE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **CR Academy of Science of Paris**, 270, serie D, 2383-2386.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell** 8, 629-643.

GOVRIN, E. M., LEVINE, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology** 10, 751-757.

GRUNDLER, F.M.W.; BÖCKENHOFF, A. (2002). Physiology of nematode feeding and feeding sites. *In*: Owen, K.J., Green, C.D., Deverall, B.J. A Benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology** 31, 47-53.

GUERENA, M. (2006). Nematodes: Alternative Controls. **ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service** 1-800-346-9140. [www.attra.ncat.org](http://www.attra.ncat.org).

HAM, K.S., KAUFFMANN, S., ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G. (1991). Host-pathogen interactions XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with  $\beta$ -1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from fungal walls. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 4(6), 545-552

HAMMERSCHMIDT, R., KUC, J. Induced resistance to disease in plant. *In*: Romeiro, R. S. (2002), **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Editora Viçosa-MG, UFV.

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. (1997). Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology** 48, 575-607.

HARTMAN, K.M., SASSER, J.N. (1985). Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. *In*: Barker, K.R., Carter, C.C., Sasser, J.N. (Eds.). **An Advanced Treatise on *Meloidogyne***. North Carolina: North Carolina State University, v.2, pp. 69-77.

HEIL, M., BOSTOCK, R.M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany** 89, 503-512.

HERMAN, M., HUSSEY, R.S., BOERMA, H.R. (1991). Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology** 23, 155-159.

HÜCKELHOVEN, R., FODOR, J., PREIS, C., KOGEL, K. H. (1999). Hypersensitive cell death na papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hidrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiology** 119, 1251-1260.

HUNT, M.D., NEUENSCHWANDER, U.H., DELANEY, T.P., WEYMANN, K. B., FRIEDRICH, L.B., LAWTON, K.A., STEINER, H.Y., RYALS, J.A. (1996) Recent advances in systemic acquired resistance research. **Gene** 179, 89-95.

HUSSEY, S.H., DAVIS, E.L., BAUM, T.J. (2002). Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 14(3), 183-194.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção agrícola municipal. (2003), **IBGE**, Tabela 1612. Disponível em: [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br). Acessado em 12/01/2003.

IMRIE, B. (2002) Cowpea. **The New Rural Industries**. Australia.

IRITI M., FAORO F. (2003) Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology** 151, 171–180.

JAN, F., YAMASHITA, K., MATSUMOTO, H., MOEDA, M. (2001). Protein and peroxidase changes in various root-cell fractions of two upland rice cultivars differing in Al tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, 46, 141-146.

JUNG, J.L., FRITIG, B., HAHNE, G. (1993). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins. **Plant Physiology** 101, 873-880.

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

KLESSIG, D.F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J. M., SHAH, J., ZHANG, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E., SILVA H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proceedings of the National Academy Science USA** 97, 8849-8855.

KUC, J. (1982). Induced immunity to plant disease. **Bioscience** 32, 854-860.

KUNZ, W., SHURTER, R., MATETZKE, T. (1997). The chemistry of benzothiadiazole plant activators. **Pesticide Science** 50, 275-282.

LAHAYE T. (2004). Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. **Trends in Plant Science** 9 (1), 1-4.

LAMB, C., DIXON, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology** 48, 251-275.

LEE, D., LEE, C.B. (2000). Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel activity assays. **Plant Science** 159, 75-85.

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R.A., LAMB C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell** 79, 583-593.

MARGIS-PINHEIRO, M., SANDRONI, M., LUMMERZHEIM, M., OLIVEIRA, D.E., (1999). A defesa da planta contra as doenças. **Ciência Hoje** vol 147.

MARTINS-MIRANDA, A.S. (2002). Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântula de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] exposta a salinidade e deficiência hídrica. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza.

MAUCH, F., MEEHL, J.B., STAEHELIN, L.A. (1992). Ethylene-induced chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanases accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. **Planta** 186, 367-375.

MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.P., (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany** 82, 535-540.

MAUCH-MANI, B., SLUSARENKO, A.J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cell** 8, 203-212.

MAYER, A.M., STAPLES, R.C., GILAD, N.L. (2001). Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry** 58, 33-41.

MEE DO, H., CHUL LEE, S., JUNG, H.W., SOHN, K.H., HWANG, B.K. (2004). 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** 166, 1297-1305.

MELLON, J.E. (1991). Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. **Plant Physiology** 95, 14-20.

NEUENSCHWANDER, U., FRIEDRICH, L., DELANEY, T., VERNOOIJ, B., KESSMANN, H., RYALS, J. (1995). Activation of plant disease resistance. **Aspects of Applied Biology** 42, 217-225.

NICHOLSON, R. L., HAMMERSCHMIDT, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology** 30, 369-389.

NIMCHUK, Z., EULGEM, T., HOLT, B.E., DANGL, J.L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. **Annual Review of Genetics** 37, 579-609.

PASCHOLATI, S.F., LEITE, B. (1994). Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **RAPP** 2, 1-51.

PASCHOLATI, S.F., LEITE, B. (1995). Hospedeiro: mecanismos de resistência. *In*: A.Bergamin Filho, H. Kimati. **Manual de Fitopatologia**, Princípios e Conceitos, L. Amorim, 3ª edição. 1, 417-453.

PEIXOTO, P.H.P. (1998). Peroxidação de lipídios em membranas de tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio. **Tese de Doutorado**. Viçosa-MG.

PIETRO, A., MADRID, M.P., CARACUEL, Z., DELGADO-JARANA, J., RONCERO, M.I.G. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology** 4 (5), 315-325.

QUINN, J., MYERS, R. (2002). Cowpea: A versatile legume for hot, dry conditions. **Jefferson institute** in Columbia MO, pg 1-4.

REBEL, E.K., JAEHN, A., VIANNA, A.S. (1976). Testes de sobrevivência do nematóide *Meloidogyne incognita* em solo, na ausência de plantas hospedeiras. **Nematologia Brasileira** 4, 85-87.

REDDIGARI, S.R., SUNDERMANN, C.A., HUSSEY, R.S. (1985). Isolation of subcellular from second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology** 17, 482-485.

REDDY, M.V.B., BELKACEMI, K., CORCUFF, R., CASTAIGNE, F., ARUL, J. (2000). Effect of pre-harvest chitosan spray in post-harvest infections by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology** 20, 39-51.

REGLINSKI, J., PATERSON, D.E., LATIMER, S., CAMPBELL, J.M., WILSON, R., PORTER, D., STURROCK, R.D., SMITH, W.E. (1997). Myocrisin-mediated oxidative stress **Clin. Chem. Acta** 268, 85-99.

RIOS, G.P. (1988). Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. *In*: ARAÚJO, J. P. P. de. WATT, E. E. (eds.). **O Caupi no Brasil**. Brasília: ITA/ EMBRAPA, cap. 19, 547-589.

ROBERSTEN, B., SVALHEIM, O. (1990). The nature of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls induced by  $\alpha$ -1,4-linked oligogalacturonides. **Physiologia Plantarum** 79, 512-518.

ROBERTS, P.A. (1995). Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. **Annual Review of Phytopathology** 33, 199.

ROMEIRO, R.S. (2002) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Editora Viçosa-MG, UFV.

RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H.Y., HUNT, M. (1996). Systemic acquired resistance. **Plant Cell**. 8, 1809-1819.

RYALS, J., UKNES, S., WARD, E. (1994). Systemic acquired resistance. **Plant Physiology** 104, 1109-1112.

SALES, M.G. (1988). Consumo, qualidade nutricional e métodos de preparo do caupi. *In*: Araújo, J.P.P., Watt, E.E. **O Caupi no Brasil**. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão. EMBRAPA. 722p.

SANTOS, J.H., VIEIRA, F.V., PEREIRA, L. (1977). **Importância relativa dos insetos e ácaros hospedados nas plantas do feijão-de-corda, nos perímetros irrigados do DNOCS, especialmente no Ceará.** 1. Primeira lista. Fortaleza, Centro de Ciências Agrárias da UFC, 29p.

SARKANEN, K.V., HERGERT, H.L. (1971). Classification and distribution. *In* LANGE, B.M., LAPIERRE, C., SANDERMANN, Jr, H. (1995). Elicitor-Induced Spruce Stress Lignin. Structural Similarity to Early Developmental Lignins. **Plant Physiology** 108,1277-1 287.

SASABE, M., TAKEUCHI, K., KAMOUN, S., ICHINOSE, Y., GOVERS, F., TOYODA, K., SHIRAIISHI, T., YAMADA, T., (2000). Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. **European Journal of Biochemistry** 267, 5005-5013.

SASSER, J.N., FRECKMAN, D.W. (1987). A world perspective on nematology: the role of the society. *In*: VEECH, J.A., DICKERSON, D.W. (Eds.). **Vistas on Nematology.** Hyattsville. pp.7-14.

SCANDALIOS, J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology Rockville** 101(1), 7-12.

SIEGEL, B.Z. (1993). Plant peroxidase an organismic perspective. **Plant Growth Regulation** 12, 303-312.

SILVA, G.S. (2000). Ocorrência e controle de fitonematóides no feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. *In*: Embrapa Meio-Norte. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil.** Teresina:, 263p.

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

SOLOMON, M., BELENGHI, B., DELLEDONNE, M., MENACHEM, E., LEVINE, A. (1999). The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell** 11, 431-443.

SPARLA, F., ROTINO L., VALGIMIGLI, M.C., PUPILLO, P., TROST, P. (2004). Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*). **Scientia Horticulturae** 110, 269-279.

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

STEINER, E., SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: Romeiro, R. S. (2002) **Indução de resistência em plantas a Patógenos**. Editora Viçosa-MG, UFV.

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.-P. (1997) Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology** 35, 235-270.

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

SUTHERLAND, M.W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 39, 79-93.

SYNGENTA (2007). Disponível em: [www.syngenta.com.br](http://www.syngenta.com.br) Acesso em 26/02/2007.

TALARCZYK, A., HENNIG, J. (2001). Early defence responses. *In* Plants infected with pathogenic organisms. **Cellular and Molecular Biology Letters** 6, 955-970.

TAYLOR, A.L., SASSER, J.N., NELSON, L.A. (1982). Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyne* species in agricultural soils. **Cooperative publication of the Department of Plant Pathology**, North Carolina State University, and U.S. Agency Int. Dev. Raleigh, N.C. 65 p.

TAYLOR, C.D. (1998). Defense responses in plants and animals - More of the same. **The Plant Cell** 10, 873-876.

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

VALENZUELA, H., SMITH, J. (2002). Cowpea. In: **Sustainable Agriculture Green Manure Crops**. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture & Human resources, University of Hawai'i Mānoa. SA-GM 6, 1-3.

van BREUSEGHEM, F., VRANOVA, E., DAT, G.F., INZÈ, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, 161, 405-414.

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 Plant Physiology** 15, 1-4.

van LOON, L.C., VAN KAMMEN, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology** 40, 199-211.

van LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 36, 453-483.

van LOON, L.C., VAN STRIEN E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-I type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 55, 85-97.

van LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 44,135–62.

VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Phytopathology** 18, 259-288.

VENISSE, J.S., MALNOY, M., FAIZE, M., PAULIN, J.P., BRISSET, M.N. (2002). Modulation of defense response of *Malus* spp. during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 15 (12), 1204-1212.

VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., AHL GOY, P., STAUB, T., KESSMANN, H., RYALS, J. (1995). 2,6-Dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 8, 228-234.

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. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell** 3, 1085-1094.

WILLIAMSON, V.M., HUSSEY, R. (1996). Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell** 8, 1735-1745.

WYSS, U., GRUNDLER, F.M.W., MUNCH, A. (1992). The parasitic behavior of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica** 38, 89-92.

YEATES, G.W., BONGERS, T., De GOEDE, R.G.M., FREACKMAN, D.W., GEORGIEVA, S.S. (1993). Feeding habits in soil nematodes families and genera – an outline for soil ecologists. **Journal of Nematology** 25, -315-331.

ZHAO, X., SCHIMITT, M., HAWES, M.C. (2000). Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. **Phytopathology** 90(11), 1239-1245.



## **CAPÍTULO 2**



---

EFEITO DO BTH SOBRE OS MECANISMOS DE DEFESA DO FEIJÃO-DE-CORDA  
[*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.]

## 2.1 – INTRODUÇÃO

As plantas são exploradas como fonte de alimento e abrigo por uma gama extensiva de predadores, incluindo vírus, bactérias, fungos, nematóides, insetos e até mesmo outras plantas. Entretanto, em seu ambiente, as plantas são resistentes à maioria dos patógenos (Scheel, 1998). De acordo com a resposta de resistência, as plantas podem ser distinguidas em: não hospedeiras e hospedeiras, com resposta de resistência específica (cultivar/raça). Em ambos os casos, os processos bioquímicos envolvidos na resistência ao patógeno são similares (Somssich e Hahlbrock, 1998).

Quando a interação entre plantas e patógenos culmina com o sucesso do patógeno na colonização dos tecidos vegetais, esta interação é dita compatível. Por outro lado, se nesta interação a planta consegue resistir ao ataque do organismo invasor ela é dita incompatível (Heil e Bostock, 2002).

Na interação incompatível as plantas se defendem contra o ataque de patógenos ativando respostas de defesa formadas por multicomponentes. A ativação de uma rede de transdução de sinais, depois do reconhecimento do patógeno pela planta, resulta na reprogramação do metabolismo celular, envolvendo grandes alterações nas atividades dos genes (Somssich e Hahlbrock, 1998). Estas alterações causam mudanças no local de infecção que incluem: i) modificações na composição da parede celular pela deposição de polissacarídeos, lignina, proteínas e glicoproteínas, que resultam no enrijecimento e fortalecimento da parede, além do acúmulo de produtos fenólicos que, juntamente com os mecanismos de proteção física da parede celular, podem inibir a penetração do patógeno; ii) estimulação das vias do metabolismo secundário, promovendo a síntese *de novo* de compostos antimicrobianos como as fitoalexinas; iii) alterações nas concentrações de reguladores de rotas bioquímicas de defesa, como ácido salicílico (SA), etileno, ácido jasmônico e metabólitos derivados de lipídios; iv) acúmulo de uma variedade de proteínas e peptídeos relacionados à defesa (Kuc, 1995; Hahn, 1996; Fritig *et al.*, 1998; Hammerschmidt, 1999) e v) resposta hipersensitiva (HR), que se caracteriza pela morte celular localizada do tecido que circunda o sítio de infecção do patógeno (van Loon, 1997; Kombrink e Schmelzer, 2001).

A resistência em plantas é manifestada pela incapacidade do patógeno em crescer e se multiplicar no tecido vegetal, o que é proporcionado, em algumas das interações incompatíveis, pela HR (Goodman e Novacky, 1994). O fenômeno da HR é caracterizado por rápida morte celular localizada no sítio de interação do patógeno com o tecido vegetal (van Loon, 1997; Kombrink e Schmelzer, 2001). Como resultado, o patógeno permanece confinado por lesões necróticas no sítio de infecção (Hammond-Kosack e Jones, 1996; Baker *et al.*, 1997; Fritig *et al.*, 1998). A HR tem sido uma resposta de defesa local eficiente contra uma variedade de patógenos incluindo, fungos, vírus, bactérias e nematóides (Walton, 1997). O desencadeamento inicial da HR é dado pela ocorrência de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sítio de infecção. Excessiva concentração de ROS no tecido vegetal causa danos que culminam com a morte celular (Lamb e Dixon, 1997; Talarczyk e Hennig, 2001).

Um aumento rápido e transiente na produção de ROS em resposta a estímulos externos caracteriza o processo de explosão oxidativa, outro fenômeno relacionado ao mecanismo de defesa vegetal. Em muitas interações incompatíveis, a produção de ROS é uma das primeiras respostas de defesa iniciada logo após a interação do patógeno com o tecido vegetal (Wojtaszek, 1997; Buchanan *et al.*, 2000).

As espécies mais típicas de ROS são: o íon superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxilas ( $HO^*$ ) (Sutherland, 1991; Lamb e Dixon, 1997; Buchanan *et al.*, 2000). Além de desencadear uma cascata de transdução de sinais que precedem a HR (Levine *et al.*, 1994; Desikan *et al.*, 1998), várias outras funções são descritas para a participação de ROS na defesa de plantas. Dentre elas, podem ser destacadas: o efeito tóxico direto dessas moléculas a vários patógenos; o envolvimento indireto no processo de lignificação da parede celular; a indução da síntese de fitoalexinas (Buchanan *et al.*, 2000) e a participação nas vias de sinalização celular (Chen *et al.*, 1993; Klessig *et al.*, 2000; Talarczyk e Hennig, 2001).

Algumas destas ROS são altamente tóxicas para o metabolismo celular. A despeito deste problema, os vegetais dispõem de sistemas antioxidantes para a remoção dessas moléculas. Estes sistemas podem ser do tipo enzimático e não-enzimático. Fazendo parte do sistema enzimático de remoção de ROS está a enzima superóxido dismutase (SOD). Esta proteína elimina os radicais superóxidos

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) por catálise de uma reação cujos produtos finais são o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), este último, podendo ser seqüestrado pela enzima ascorbato peroxidase (APX) que catalisa a redução do peróxido para água ou pela enzima catalase (CAT) que o converte em oxigênio e água (Buchanan *et al.*, 2000; Talarczyk e Hennig, 2001). As catalases são oxidoredutases que ocorrem em formas múltiplas nos tecidos vegetais e são utilizadas em mecanismos enzimáticos primários por organismos aeróbicos para a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Siegel, 1993).

Além das respostas locais descritas acima, as plantas também exibem um mecanismo não específico e sistêmico de resistência conhecido como resistência sistêmica adquirida (SAR), um processo de defesa induzido que tem papel central na resistência das plantas contra patógenos (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; van Loon, 1997; Fritig *et al.*, 1998; Anfoka, 2000).

A SAR é caracterizada pela ativação e acúmulo coordenado de mRNAs que codificam para um conjunto de genes de defesa (genes SAR) em sítios distantes do local de infecção, promovendo, assim, proteção sistêmica (Ward *et al.*, 1991). Outra característica da SAR é que não só a invasão do patógeno pode induzi-la (Kessmann *et al.*, 1994; Hutcheson, 1998), pois certos compostos tanto bióticos quanto abióticos são, também, efetivos (Walton, 1997). Estas moléculas, que induzem ou amplificam as respostas de defesa, são chamadas de elicitores e podem ser de origem endógena, quando provenientes da planta hospedeira, ou exógena, quando do agente agressor ou do meio ambiente. Podem ser de natureza protéica, lipídica, polissacarídica ou outras (Cordeiro e Sá, 1999; Buchanan *et al.*, 2000).

Estudos moleculares têm caracterizado com detalhe o processo de expressão de genes relacionados à defesa vegetal que ocorre após tratamento com elicitores (Hahn, 1996; Walton, 1997; Hutcheson, 1998). Tratamento de plantas com ácido salicílico (SA), ou seus análogos funcionais como ácido dicloroisonicotínico (INA), ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH) e ácido β-aminobutírico, pode induzir a SAR sem que haja a interação da planta com o patógeno (Cohen *et al.*, 1994; Dong, 1998; Anfoka, 2000).

Dentre os diversos produtos gênicos da SAR estão as proteínas relacionadas a patogênese (PR-proteínas) (Sparla *et al.*, 2004; van Loon *et al.*, 2006). São proteínas induzidas no processo de defesa de muitas espécies de plantas contra a infecção causada por fungos, bactérias, vírus, nematóides e ataque de insetos (van Loon *et al.*, 2006).

As PR-proteínas são classificadas em dezessete famílias que 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, 1998), até a modificação da parede celular de microrganismos patogênicos, como as  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases (Mee Do *et al.*, 2004).

$\beta$ -1,3-glucanases são enzimas líticas capazes de degradar  $\beta$ -1,3-glucanos, sendo classificadas como PR-proteínas pertencentes à família PR-2. Essas hidrolases podem estar envolvidas na defesa das plantas contra fungos, uma vez que os polímeros de  $\beta$ -1,3-glucanos se encontram abundantemente distribuídos na parede celular fúngica (Sticher *et al.*, 1997). Vários tipos e isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanases estão presentes constitutivamente em plantas. Estas enzimas têm sua expressão induzida ou aumentada pela infecção de patógenos, tratamento com elicitores de respostas de defesa e condições de estresse mecânico, químico e ambiental (van Loon *et al.*, 2006).

A família nove das PR-proteínas (PR-9) encerra tipos específicos de peroxidases. Estas enzimas são óxido-redutases que atuam nos processos de construção da parede celular. Estes processos incluem o reforçamento da parede celular, por catalisarem determinadas reações de óxido-redução, cujos produtos finais poderão, em outras reações, dar origem aos compostos precursores do polímero de suberina e lignina. Uma vez reforçada a parede celular, atua protegendo a integridade celular contra a tentativa de invasão do patógeno (van Loon *et al.*, 2006). Alterações nos níveis de expressão de peroxidase e no seu padrão de isoformas podem, também, ser ocasionadas por estresse ambiental, tratamento químico e infecção por microrganismos e têm sido observadas em vários sistemas vegetais (Shimoni, 1994; Cipollini, 1998; Caruso *et al.*, 1999).

Em adição aos genes de resistência e genes que codificam proteínas de transdução de sinais, as plantas possuem genes de defesa que estão envolvidos no metabolismo secundário, como a via do *shikimato* e fenilpropanóides que leva à produção de lignina, ácido salicílico, dentre outros compostos secundários de defesa como as fitoalexinas (Somssich e Hahlbrock, 1998).

A lignificação é um processo de defesa caracterizado pelo espessamento e enrijecimento da parede celular, ocasionados pela deposição de lignina, um biopolímero fenólico resistente à degradação microbiana, que representa uma das

mais importantes barreiras físicas à entrada de patógenos (Vance *et al.*, 1980). O aumento na concentração de lignina tem sido observado na interação de plantas com patógenos e está freqüentemente limitado às células localizadas no sítio de infecção (Vance e Sherwood, 1976; Ray e Hammerschmidt, 1998; Stadnik e Buchenauer, 2000). Vários trabalhos também apresentam o acúmulo de lignina em plantas tratadas com diferentes elicitores de reações de defesa. Juntos, estes dados evidenciam o importante papel do processo de lignificação na defesa vegetal (Vance *et al.*, 1980; Lange *et al.*, 1995; Vander *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2003).

O complexo processo de biossíntese da lignina envolve enzimas como a fenilalanina amônia liase (PAL), responsável pela conversão do aminoácido fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e a enzima peroxidase (POX), que catalisa a oxidação do álcool cinamil no passo final da biossíntese (Schoemaker e Piontek, 1996; Ray, 1998). O aumento na atividade destas enzimas acompanha a lignificação do tecido vegetal na resposta de defesa da planta (Vance *et al.*, 1980).

Todos estes mecanismos descritos são determinantes para a resposta de defesa vegetal e seu entendimento pode conduzir a estratégias de aumento e indução de resistência em culturas vegetais economicamente importantes que são constantemente atacadas por patógenos.

Indução de resistência sistêmica em plantas contra patógenos é uma prática difundida que tem sido intensivamente investigada no que diz respeito ao entendimento das vias de sinalização que estão envolvidas neste processo, ao potencial do uso desta estratégia na proteção de plantas (Heil e Bostock 2002), bem como, na busca por novos elicitores que possam induzir, em plantas suscetíveis, resistência contra patógenos (Hutcheson 1998; Padidam, 2003; Cavalcanti *et al.*, 2006).

O emprego destas moléculas elicitoras da resposta de defesa representa, atualmente, uma das ferramentas utilizadas para aumentar a resistência de plantas (Cordeiro e Sá, 1999; Buchanan *et al.*, 2000).

O uso de compostos capazes de induzir a SAR, como o BTH, é uma alternativa promissora na tentativa de potencializar as defesas naturais das plantas, o que poderá resultar em um melhor controle de várias doenças. O BTH é um produto químico análogo do SA e conhecido por induzir a SAR (Sparla *et al.*, 2004).

O BION<sup>®</sup> 500 WG, nome comercial do BTH dado pela empresa Italiana Syngenta, é um ativador de plantas e não tem ação direta contra patógenos.

Aplicado na parte aérea das plantas, ativa os seus próprios mecanismos naturais de defesa e aumenta sua resistência às doenças. Devido ao seu modo de ação particular, o produto deve ser aplicado antes da entrada dos patógenos, de forma preventiva. O produto é rapidamente absorvido pelos tecidos foliares e se transloca sistemicamente, tanto para as folhas quanto para as raízes, ativando, assim, a planta de forma generalizada (Syngenta, 2007). Ele recebe particular atenção por possuir baixa toxicidade para plantas, animais e para o meio ambiente e, ainda, alta eficiência na proteção de numerosas espécies de plantas contra uma variedade de patógenos (Iriti e Faoro, 2003; Syngenta, 2007).

Culturas como a do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] são continuamente atacada por patógenos e pragas (Sobrinho *et al.*, 2000) e a indução dos mecanismos de defesa por compostos químicos como o BTH pode ser uma alternativa de controle de doenças, que poderá vir a promover ganho econômico para a agricultura nas regiões de maior cultivo dessa leguminosa.

O feijão-de-corda é uma das mais antigas culturas conhecidas pelos homens. Seu cultivo mundial abrange, aproximadamente, 8.094.000 hectares (Quinn e Myers, 2002), com produção excedendo aos 2 milhões de toneladas. Esta cultura tem sido amplamente cultivada por pequenos produtores das regiões mais pobres do Brasil. Sua comercialização tem sido crescente, apesar da baixa produtividade alcançada. Boa qualidade nutricional atrelada a um baixo custo de produção são características do feijão-de-corda que justificam o desenvolvimento de pesquisas que gerem conhecimentos técnicos e ainda tecnologias capazes de aumentar a produtividade, comercialização e difusão desta cultura no país, especialmente, nas regiões onde se encontram povos com maiores carências alimentícias e econômicas (Cardoso, 2000).

O estudo do processo de indução e amplificação da resposta de defesa em plantas pelo BTH é de grande valor, visto que o emprego deste composto pode representar uma importante estratégia para aumentar a resistência de plantas econômica e nutricionalmente importantes como o feijão-de-corda.

## 2.2 – MATERIAIS

### 2.2.1 – Material Vegetal

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, utilizadas no presente trabalho, foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Meio-Norte, Unidade do Estado do Piauí e mantidas à temperatura de 8 °C, até sua utilização.

### 2.2.2 – Reagentes Químicos

Acetato de sódio, acetona, ácido acético, ácido anidrido acético, ácido clorídrico, ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (TCA), acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), arseniato de sódio, azida sódica, azul brilhante de coomassie G e R, azul de bromofenol, bicarbonato de sódio, *N,N*-metileno-bisacrilamida, 3-amino-9-etil-carbazole, carbonato de sódio anidro, cloreto de sódio (NaCl), *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), etanol, fosfato de potássio, fosfato de sódio, glicerol, glucose, *N*-acetil-D-glucosamina (NAG), glucuronidase, guaiacol, hipoclorito de sódio, laminarina, dodecil sulfato de sódio (SDS),  $\beta$ -mercaptoetanol, metanol, L-metionina, “*p*-nitro blue tetrazolium” (NBT), peróxido de hidrogênio, persulfato de amônio, quitina coloidal, quitosana, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), riboflavina, sulfato de sódio anidro, tartarato de sódio e potássio, tetraborato de sódio e potássio, *N*, *N*, *N*', *N*'-tetrametiletilenodiamino (TEMED), tris-HCl e triton X-100 foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis USA.

Bion<sup>®</sup> foi usado como fonte do indutor de resistência, Ácido (1,2,3)-Benzotiadiazol-7-Carbotióico S-metil Éster (BTH), que é um dos constituintes deste produto comercial fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 2.3 – MÉTODOS

### 2.3.1 – Experimento I: Tratamento Foliar de Plantas de Feijão-de-Corda com BTH

#### 2.3.1.1 – Condições de Plantio

Sementes de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E, foram previamente selecionadas para germinação de acordo com tamanho, conformação e cor. A desinfestação superficial destas sementes foi feita com hipoclorito de sódio contendo 0,05% de cloro ativo, por 3 minutos. O hipoclorito residual foi removido por lavagem abundante com água destilada. Em seguida, estas sementes foram submetidas à embebição em água destilada, por período de 20 minutos, para pré-hidratação.

A germinação foi realizada em potes plásticos (1 litro), contendo, como substrato, areia retirada de leito de rio e lavada em água corrente, seguida de água destilada, e autoclavada (121 °C,  $9,8 \times 10^4$  Pascal) por duas vezes, durante 30 minutos, em intervalos de 24 horas entre as duas autoclavagens. Os potes foram mantidos em condições de casa de vegetação com temperatura média de 30 °C durante o dia e 25 °C durante a noite. As plantas foram regadas com água destilada até o sexto dia de plantio sendo, a partir daí, regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Silveira *et al.* (2001), aplicada em diluições decrescentes.

#### 2.3.1.2 – Pulverização com BTH e Coleta das Plantas

Grânulos de Bion<sup>®</sup> (CGA 245704), contendo 50% do ingrediente ativo (i.a), acibenzolar-S-metil, foram dissolvidos em água grau Milli-Q, nas concentrações finais de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM de i.a. O tratamento foi feito através da pulverização da parte aérea das plantas com 250 µL das soluções aquosas de BTH, no décimo dia após plantio (DAP) (FIGURA 2.1). Plantas controles foram pulverizadas apenas com água grau Milli-Q (Sparla *et al.*, 2004).



FIGURA 2.1 – Tratamento, através de pulverização da parte aérea de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], com 250  $\mu$ L das soluções aquosas de BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM de i.a, no décimo dia após plantio.

Decorridas 48 horas do tratamento, as plantas foram coletadas e divididas em folhas, caules e raízes. Após lavagem em água de torneira, seguida de água destilada, os tecidos foram secados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a - 80 °C. Para avaliação dos teores de lignina, folhas primárias e secundárias foram coletadas com 10 e 15 dias após tratamento.

### 2.3.1.3 – Preparo dos Extratos Protéicos

Os extratos totais foram obtidos através de maceração, em separado, das partes das plantas (folha, caule e raiz), com auxílio de gral e pistilo, sob banho de gelo, na presença de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. A extração foi feita na proporção de 1:3 (m/v). Após maceração, realizada por cerca de 10 minutos, a suspensão foi filtrada em tecido de trama fina e centrifugada (15.000 x g, 4 °C, 20 minutos). O sobrenadante, denominado de extrato total, foi exaustivamente dialisado contra tampão de extração e estocado em ultrafreezer a - 80 °C para determinação dos teores de proteínas solúveis totais e análises enzimáticas.

### 2.3.2 – Experimento II: Tratamento das Sementes de Feijão-de-Corda com BTH

#### 2.3.2.1 – Tratamento das Sementes

O tratamento consistiu em imergir as sementes previamente selecionadas e submetidas à assepsia, conforme descrito no item 2.3.1.1, em soluções aquosas contendo 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM i. a. de BTH ou apenas em água grau Milli-Q (controle). Foi utilizada a proporção de 10 mL de solução aquosa de BTH ou água por semente. As sementes ficaram mergulhadas por período de 24 horas (Latunde-Dada e Lucas, 2001) sob aeração (FIGURA 2.2).

### 2.3.2.2 – Condições de Plantio

Sementes previamente tratadas, conforme item anterior, foram cultivadas ou em papel de germinação (Germitest<sup>®</sup>) ou em areia.

Para cultivo em papel, as sementes foram colocadas para germinar em papel pH neutro, nas dimensões de 28 x 38 cm, esterilizados em autoclave a 121 °C,  $9,8 \times 10^4$  Pascal, durante 20 minutos. O semeio ocorreu em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. As sementes, em número de 12, foram dispostas em uma única fileira, sobre três folhas de papel sobrepostas, a uma distância média de 5 cm do ápice da folha e 2 cm das bordas laterais. Após a distribuição das sementes, o papel foi dobrado na forma de um cartucho, sendo que cada grupo de três cartuchos de papel foram envoltos por uma única folha de papel de germinação. O conjunto foi então umedecido com água grau Milli-Q, estéril, com volume correspondendo a 2,5 vezes a sua massa de matéria seca, quantidade esta recomendada para leguminosas pelo Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (Brasil, 1991). Em seguida, este conjunto foi colocado dentro de saco plástico transparente, com o objetivo de manter as condições assépticas e a umidade (FIGURA 2.3). Os sacos contendo os cartuchos de papel foram dispostos verticalmente em câmara de crescimento, sendo a germinação conduzida a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de  $110 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$  (Martins-Miranda, 2002).



FIGURA 2.2 – Tratamento de sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] através de imersão, por 24 horas, em soluções aquosas de BTH (0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM). A relação utilizada foi de 10 mL de solução de BTH ou água grau Milli-Q (controle) por semente.

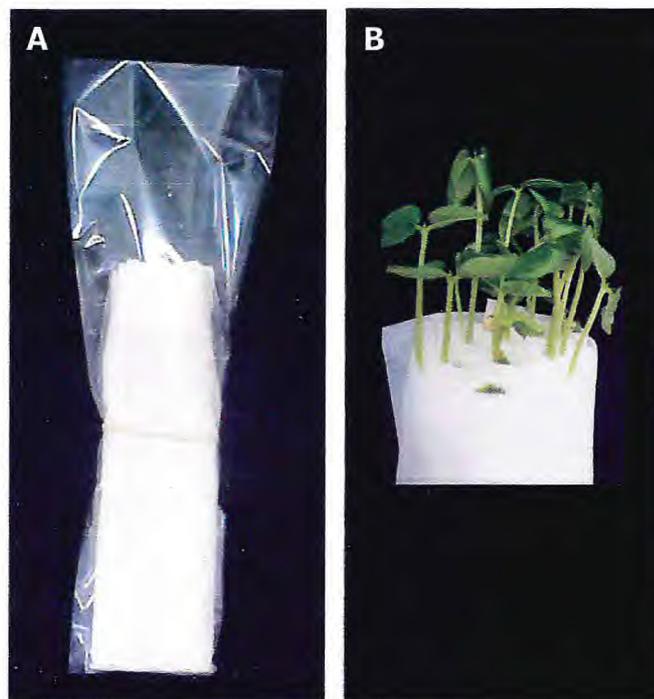


FIGURA 2.3 – Semeadura das sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], previamente tratadas com diferentes concentrações de BTH ou água Milli-Q, em papel de germinação (Germitest<sup>®</sup>) (A) e parte aérea das plantas, oito dias após semeadura (B).

Outros lotes de sementes tratadas foram cultivados em potes de plástico (1 litro), contendo areia retirada de leito de rio como substrato, previamente lavada e esterilizada conforme item 2.3.1.1. Os potes permaneceram em condições de casa de vegetação, com temperatura média de 30 °C durante o dia, recebendo luz natural, e 25 °C durante a noite. As plantas foram regadas com água destilada até o sexto dia de plantio sendo, a partir daí, regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada por Silveira *et al.* (2001), aplicada em diluições decrescentes.

#### 2.3.2.3 – Coleta das Plantas

Quando o cultivo foi em papel, as coletas foram realizadas 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS). As plantas coletadas foram separadas em cotilédones e eixo embrionário para os tempos de 1 e 2 dias após semeadura e cotilédones, folhas, caules e raízes para plantas coletadas com 5 e 8 dias após semeadura. Os tecidos vegetais foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80 °C.

Folhas de plantas provenientes de sementes tratadas, cultivadas em areia, foram coletadas 30 dias após plantio para avaliação dos teores de lignina.

#### 2.3.2.4 – Preparo dos Extratos Protéicos

Para obtenção dos extratos protéicos totais, tecidos vegetais (cotilédones, eixos embrionários, folhas, caules e raízes) foram macerados, separadamente, sob banho de gelo, na presença de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, contendo, EDTA 10 mM, e 1% de Triton X-100. A extração foi feita na proporção de 1:5 (m/v). Após maceração, realizada por cerca de 10 minutos, a suspensão foi centrifugada a 20.000 x g, 4 °C, durante 20 minutos e o sobrenadante, denominado de extrato total, foi armazenado em ultrafreezer a -80 °C e, posteriormente, utilizado para avaliação eletroforética do perfil de proteínas solúveis e atividades enzimáticas (zimogramas).

### 2.3.3 – Dosagem de Proteínas Solúveis Totais

A dosagem de proteínas solúveis dos extratos foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), com base em curva padrão ajustada a partir de doses crescentes de albumina sérica bovina (BSA). As leituras das absorvâncias foram monitoradas a 595 nm (espectrofotômetro modelo Ultrospec III, Pharmacia) 10 a 20 minutos após adição de 2,5 mL do reagente de Bradford a 100  $\mu\text{L}$  do extrato. Os resultados foram expressos em miligrama de proteína por grama de matéria fresca ( $\text{mgP g}^{-1}\text{MF}$ ).

### 2.3.4 – Determinação da Atividade de Peroxidasas (POX, EC 1.11.1.7)

A metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991) foi utilizada para a determinação da atividade peroxidásica. Guaiacol foi utilizado como substrato doador de prótons e o peróxido de hidrogênio como receptor. A reação catalisada pela peroxidase produz um composto colorido, 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona (Doerge *et al.*, 1997), cuja concentração é medida espectrofotometricamente. Um volume de 30  $\mu\text{L}$  do extrato bruto, previamente diluído, foi adicionado a 500  $\mu\text{L}$  de guaiacol 0,02 M e 500  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 0,06 M num volume final de ensaio de 2,0 mL, completado com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. A mistura reacional foi incubada durante 2 minutos, a 30 °C, e a absorvância medida a 480 nm. Uma unidade de atividade peroxidásica (1 UAP) foi definida como sendo a variação de 1,0 unidade de absorvância por minuto, a 480 nm.

### 2.3.5 – Determinação da Atividade de $\beta$ -1,3-Glucanase (GLU, EC 3.2.1.6)

A atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase foi determinada por medida da velocidade de liberação de monômeros de glucose a partir da ação hidrolítica da enzima sobre o substrato laminarina, como descrito por Boller (1993). A solução de laminarina (2,0 mg/mL), diluída em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foi aquecida a 60 °C por 10 minutos e dialisada, exaustivamente, contra tampão de

diluição, para remoção de glucose livre. Uma mistura reacional consistindo de 100  $\mu\text{L}$  de extrato bruto mais 900  $\mu\text{L}$  de solução de laminarina foi incubada a 50 °C, durante 30 minutos. A seguir, foi adicionado 1,0 mL da solução "D" (1,0 mL da solução "B" mais 25,0 mL da solução "A", preparada no momento do ensaio), sendo a mistura fervida, em banho-maria, durante 20 minutos. Após resfriamento em água corrente de torneira, por 5 minutos, foi acrescentado 1,0 mL da solução "C" (3,0 g de arseniato de sódio + água grau Milli-Q q.s.p. 25,0 mL). Os tubos foram vigorosamente agitados em vortex, até completa remoção dos gases, sendo, em seguida, deixados em repouso, por 5 minutos. A mistura foi, então, diluída 3 vezes com água grau Milli-Q. As leituras de absorbância foram feitas a 520 nm. A solução "A" consistiu de 25,0 g de carbonato de sódio anidro, 25,0 g de tartarato de sódio e potássio, 20,0 g de bicarbonato de sódio, 200,0 g de sulfato de sódio anidro e água grau Milli-Q q.s.p. 1000 mL. A solução "B" consistiu de 15,0 g de sulfato de cobre hidratado, 20  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico concentrado e água grau Milli-Q q.s.p. 100 mL. Uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de glucose, preparada em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, variando de 7,5 a 240  $\mu\text{g/mL}$ , foi usada para o cálculo da quantidade de açúcar liberada na reação. A atividade  $\beta$ 1,3-glucanásica foi expressa em nanokatal por grama de massa de tecido fresco ( $\text{nKat g}^{-1} \text{MF s}^{-1}$ ), onde 1,0 nKat equivale a 1,0 nmol de glucose liberado por segundo, nas condições do ensaio.

#### 2.3.6 – Determinação da Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.11)

A atividade catalásica foi determinada de acordo com a metodologia de Havir e McHale (1987). Um volume de 100  $\mu\text{L}$  do extrato protéico vegetal foi adicionado a 2,9 mL de uma solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,0125 M em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0. O ensaio teve duração de 2 minutos e foi realizado a 30 °C. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, em um intervalo de 30 segundos. A atividade catalásica foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson *et al.*, 1995) e expressa em micromol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por grama de matéria fresca ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{gMF}$ ).

### 2.3.7 – Determinação da Atividade de Fenilalanina Amônia Liase (PAL, EC 4.3.1.5)

A atividade de fenilalanina amônia liase foi determinada segundo Barreto, (2005), que combinou os métodos descritos por Mori *et al.* (2001) e El-Shora (2002). A mistura reacional foi preparada pela adição de 480 µL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,8, 20 µL de β-mercaptoetanol 0,05 M, 200 µL de L-fenilalanina 0,04 M e 200 µL de extrato bruto. Em seguida, esta mistura foi incubada por 1 hora, a 30 °C. A reação foi parada pela adição de 100 µL de HCl 6 N. L-fenilalanina foi adicionada aos controles após incubação e a adição de HCl. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g, por 20 minutos, a 25 °C, e as absorvâncias dos sobrenadantes medidas a 290 nm. Uma unidade de atividade (UA) foi representada pela conversão de 1 µmol do ácido trans-cinâmico produzido por grama de massa fresca por segundo (µmol/gMF/s). A atividade da PAL foi determinada com base em curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de ácido trans-cinâmico (0,01-0,1 µg ácido trans-cinâmico/mL).

### 2.3.8 – Eletroforese Unidimensional de Proteínas Solúveis Totais

Eletroforeses das amostras foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Davis (1964) e Ornstein (1964). A preparação do gel e a corrida eletroforética foram conduzidas no sistema "Mighty Small II", modelo SE250-10A-75 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.). O gel de aplicação (1,5 mm de espessura), continha 3,5% de acrilamida preparada em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o gel de separação (1,5 mm de espessura) foi preparado utilizando acrilamida, na concentração de 12,5%, 10% ou 7% dissolvida em tampão Tris-HCl, 3,0 M, pH 8,8. TEMED e persulfato de amônio foram utilizados para polimerização dos géis.

Os extratos totais das amostras foram diluídos em tampão de amostra Tris-HCl 120 mM, pH 6,8, contendo 10% de glicerol, 5 mM de EDTA, 0,5 de mM EGTA e 0,015% de azul de bromofenol. As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976) e a mesma quantidade de proteínas para os diferentes extratos foi, então, aplicada no gel. A corrida foi desenvolvida a 20 mA, a 25 °C.

Para eletroforeses em condições desnaturantes (Laemmli, 1970), SDS foi acrescentado nas soluções para preparação dos géis, no tampão de amostra e no tampão de corrida. A detecção das proteínas totais resolvidas na corrida eletroforética foi feita através da revelação dos géis (12,5% de acrilamida) com nitrato de prata, segundo procedimento descrito por Blum *et al.* (1987).

### 2.3.9 – Atividades Enzimáticas Reveladas em Géis de Eletroforese

Ao final da corrida eletroforética, conforme item 2.3.8 para eletroforese nativa, os géis preparados com 10% de acrilamida foram mergulhados em 20,0 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,01% (m/v) de 3-amino-9-etil-carbazole 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio e 0,2% (v/v) de guaiacol para revelação de bandas protéicas com atividade peroxidásica. Após aparecimento das bandas, a reação foi interrompida por sucessivas lavagens com água destilada (Caruso *et al.*, 1999).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em géis de poliacrilamida (12,5%) foi detectada pela monitoração de sua habilidade em inibir a redução fotoquímica do Nitroblue Terazolium (NBT). O NBT é reduzido por radicais superóxidos gerados fotoquimicamente. Após eletroforese em condições nativas, conforme descrito no item 2.3.8, o gel foi mergulhado em solução 0,25 mg/mL de NBT e 0,1 mg/mL de riboflavina, sendo exposto à luz. A presença de atividade foi visualizada como bandas acromáticas em fundo azulado (Martinez *et al.*, 2001).

Para a visualização das isoformas de CAT (Scandalios, 1969), os géis preparados na concentração de 7% de acrilamida foram incubados por 30 minutos em solução aquosa contendo 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O excesso de peróxido foi removido por lavagens sucessivas com água e o gel incubado em solução de revelação (1% (m/v) de FeCl<sub>3</sub>, 1% (m/v) de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>). As bandas acromáticas denotando atividade catalásica foram rapidamente visualizadas em fundo escuro.

### 2.3.10 – Avaliação dos Teores de Lignina

A determinação de lignina foi realizada segundo metodologia descrita por Stange e McDonald (1999), com modificações para tecido foliar. As folhas coletadas foram descoradas em solução de ácido tricloroacético (TCA) (1,5 g de TCA em 750 mL de etanol + 250 mL de clorofórmio) até completa remoção dos pigmentos (FIGURA 2.4 A). Em seguida, estas folhas foram imersas em solução padrão de bissulfito de sódio, contendo 40 mM de SO<sub>2</sub>, por 2 horas, com duas trocas, à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas através de imersão, durante 4 horas, em solução padrão contendo 1% (v/v) do reagente de Schiff acrescido de 1 mL/L de HCl 2 N. Após este último passo, as folhas foram lavadas com a solução padrão. A cor foi detectada usando um colorímetro (Minolta Crono meter CR-200 modo "L\* a \*b\*"). A diferença de cor,  $\Delta E^*_{ab}$ , foi calculada pela fórmula  $\Delta E^*_{ab} = ((L_B - L_A)^2 + (a_B - a_A)^2 + (b_B - b_A)^2)^{1/2}$ , onde B e A denotam a cor antes e após coloração das folhas, respectivamente.

### 2.3.11 – Análises Estatísticas

Delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições para cada tratamento, foi empregado sendo, cada parcela, representada por três plantas.

Teste *t* de Student, a 5% de significância, foi realizado com o auxílio do Software SISVAR (Daniel Furtado Ferreira, 2003. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil).

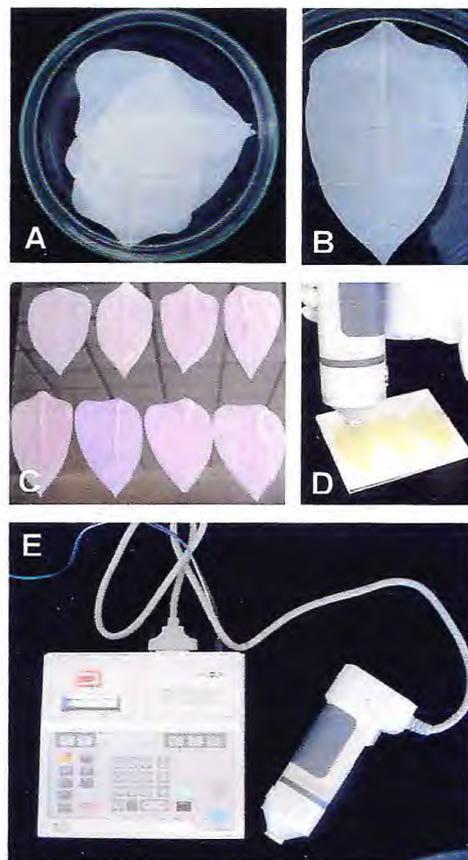


FIGURA 2.4 – Metodologia para determinação de lignina em folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] após terem sido descoradas (A e B) em solução de TCA/etanol/clorofórmio e coradas com reagente de Schiff (C). As leituras (D e E) foram feitas com o auxílio de colorímetro (Minolta Crono meter CR-200 modo “L\* a \*b\*”).

## 2.4 – RESULTADOS

### 2.4.1 – Efeito do Tratamento Foliar com BTH nas Atividades Enzimáticas

#### 2.4.1.1 – Proteínas Solúveis Totais

O tratamento de plantas de feijão-de-corda com BTH, nas diferentes concentrações usadas, não foi fitotóxico nem interferiu no desenvolvimento das mesmas no período de 48 horas após tratamento, quando comparadas às plantas não tratadas (controles).

Os teores de proteínas solúveis foram avaliados em extratos totais de folhas, caules e raízes provenientes de plantas controles e tratadas com BTH, nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM (i. a) e coletadas 48 horas após tratamento. As folhas foram as que apresentaram maior concentração de proteínas totais quando comparadas com caules e raízes (FIGURA 2.5). Ademais, elas mostraram aumento dose-dependente nestes teores, sendo que os tratamentos nas concentrações de 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM apresentaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) quando comparados com o tratamento controle (FIGURA 2.5 A). Em extratos de caules e raízes as diferenças observadas entre tratamentos e respectivos controles foram menos expressivas. Apenas nos tratamentos com 0,1; 0,8; 2,0 e 5,0 mM para caule (FIGURA 2.5 B) e 0,3 mM para raiz as quantidades de proteína foram aumentadas (FIGURA 2.5 C).

A fim de confirmar os resultados das alterações nos níveis de proteínas, eletroforeses em condições desnaturantes, reveladas com nitrato de prata, foram feitas. As quantidades de proteínas aplicadas nos géis para extratos de folhas, caules e raízes de plantas tratadas e controles foram as mesmas. Entretanto, os resultados obtidos não foram conclusivos, pois não foi observada correlação entre os diferentes padrões eletroforéticos e os tratamentos em nenhum dos tecidos analisados (FIGURA 2.6).

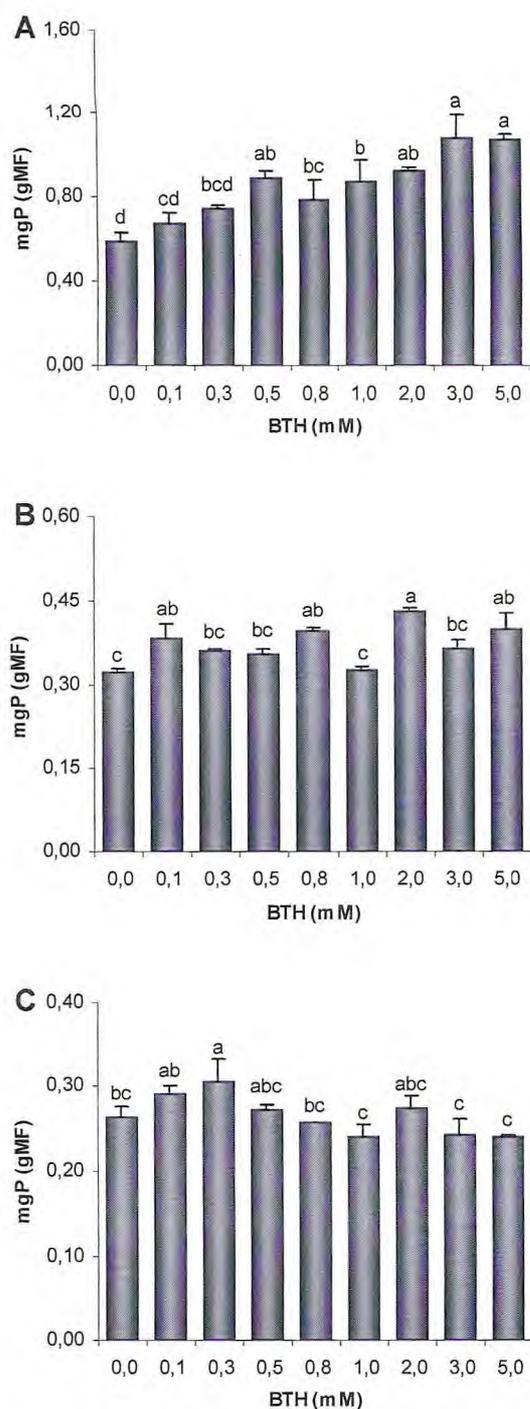


FIGURA 2.5 – Proteínas solúveis totais de folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

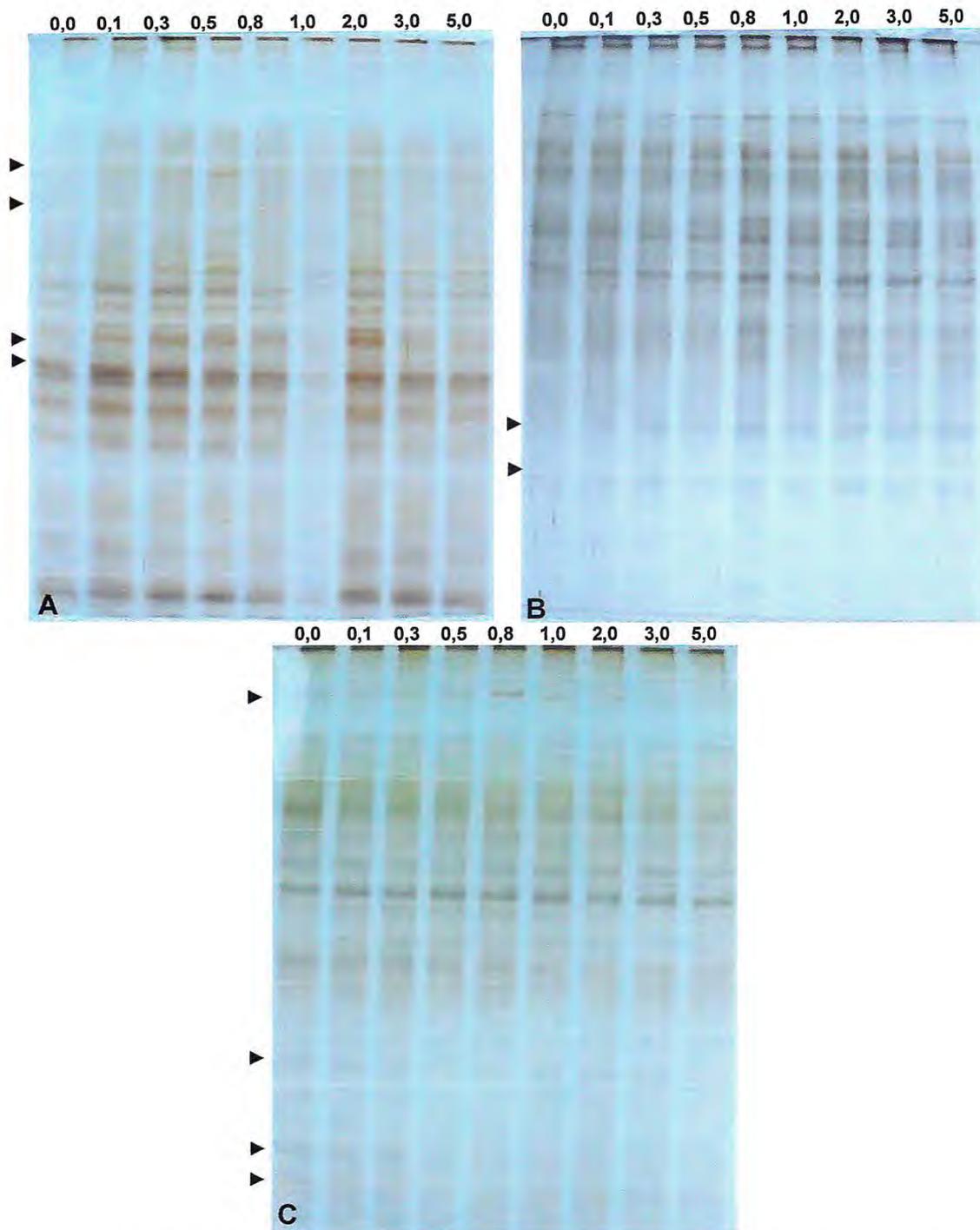


FIGURA 2.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) de extratos de proteínas solúveis totais de folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Setas indicam diferenças no padrão de bandas.

#### 2.4.1.2 – Fenilalanina Amônia Liase

Alterações na atividade da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) em tecidos de folhas, caules e raízes provenientes de plantas pulverizadas com BTH foram avaliadas neste experimento. Dentre os órgãos de plantas controles avaliados, as folhas foram os que apresentaram maior atividade de PAL (10,2  $\mu\text{mol/gMF/s}$ ). Em caules e raízes os valores obtidos foram de 8,2  $\text{UA}\mu\text{mol/gMF}$  e 8,6  $\text{UA}\mu\text{mol/gMF}$ , respectivamente (FIGURA 2.7). Nos tecidos foliares, apenas os tratamentos de 2,0 e 3,0 mM de BTH causaram aumentos significativos ( $p \leq 0,05$ ) na atividade da enzima PAL, quando comparados ao controle (FIGURA 2.7 A). Para caules, os tratamentos com maiores concentrações de BTH (0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM) não alteraram a atividade da PAL (FIGURA 2.7 B). Contudo, o tratamento com BTH na concentração de 0,5 mM foi capaz de causar aumento significativo na atividade da enzima PAL, quando comparado ao controle. Já em raízes apenas a concentração de 0,3 mM foi capaz de induzir aumento da atividade da PAL (FIGURA 2.7 C).

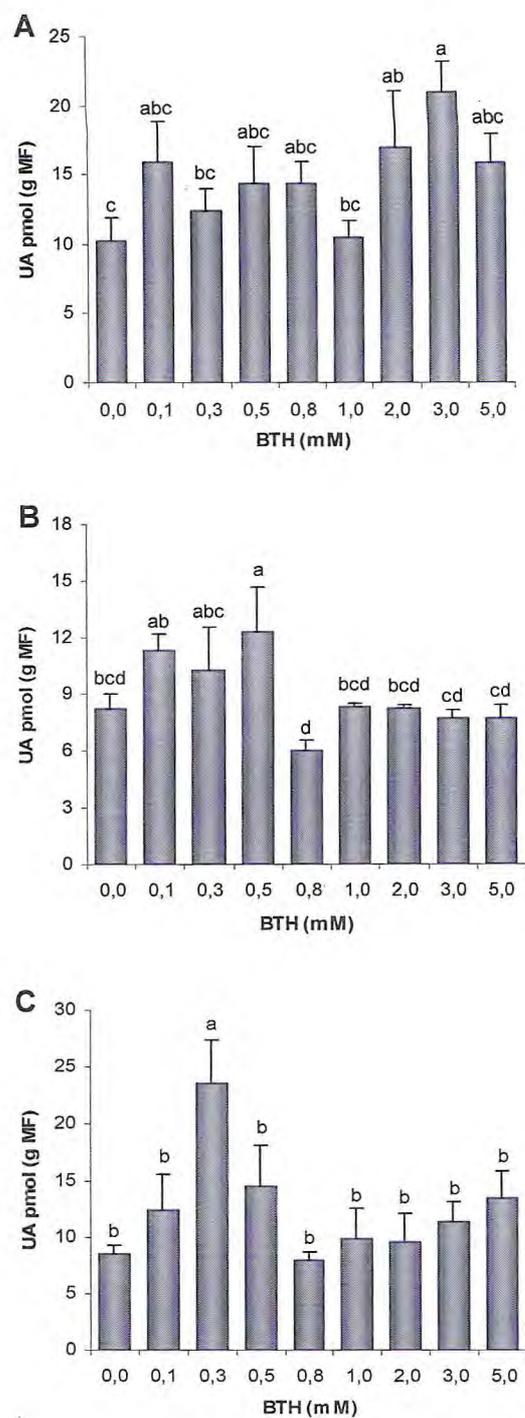


FIGURA 2.7 – Atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

#### 2.4.1.3 – PR-proteínas

Quando as plantas controles foram analisadas, o tecido radicular foi o que apresentou maior atividade basal de peroxidase (POX) entre os três analisados. Foi três vezes maior que a observada em folhas e dez vezes maior que em caule. Em folhas, o tratamento com BTH nas concentrações de 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM induziu aumento na atividade de POX quando comparado com o respectivo controle (FIGURA 2.8 A). Este efeito de indução de aumento da atividade de POX foi confirmado em gel de poliacrilamida (zimograma), onde foi possível observar que os tratamentos a partir de 0,1 mM induziram aumento na intensidade das bandas (FIGURA 2.9 A). Em caule (FIGURA 2.8 B), apenas a concentração de 2,0 mM de BTH foi capaz de aumentar a atividade de POX em relação ao controle. Em relação à atividade de POX nas raízes, não foi evidenciado aumento neste tecido, independentemente das concentrações testadas de BTH (FIGURA 2.8 C). Este resultado foi confirmado através da análise do zimograma correspondente (FIGURA 2.9 B).

Para a enzima GLU, em tecidos foliares (FIGURA 2.10 A) houve tendência de aumento crescente, dose-dependente, de atividade até a concentração de 3,0 mM. A partir da concentração de 1,0 mM foi verificado o estabelecimento de um platô com médias similares, mas diferindo, significativamente, do controle (FIGURA 2.10 A). No caule, os tratamentos com 0,1; 0,8; 2,0; 3,0 e 5,0 mM de BTH causaram aumento na atividade da GLU (FIGURA 2.10 B), enquanto em raízes tratadas houve aumento apenas na concentração de 2,0 mM de BTH (FIGURA 2.10 C).

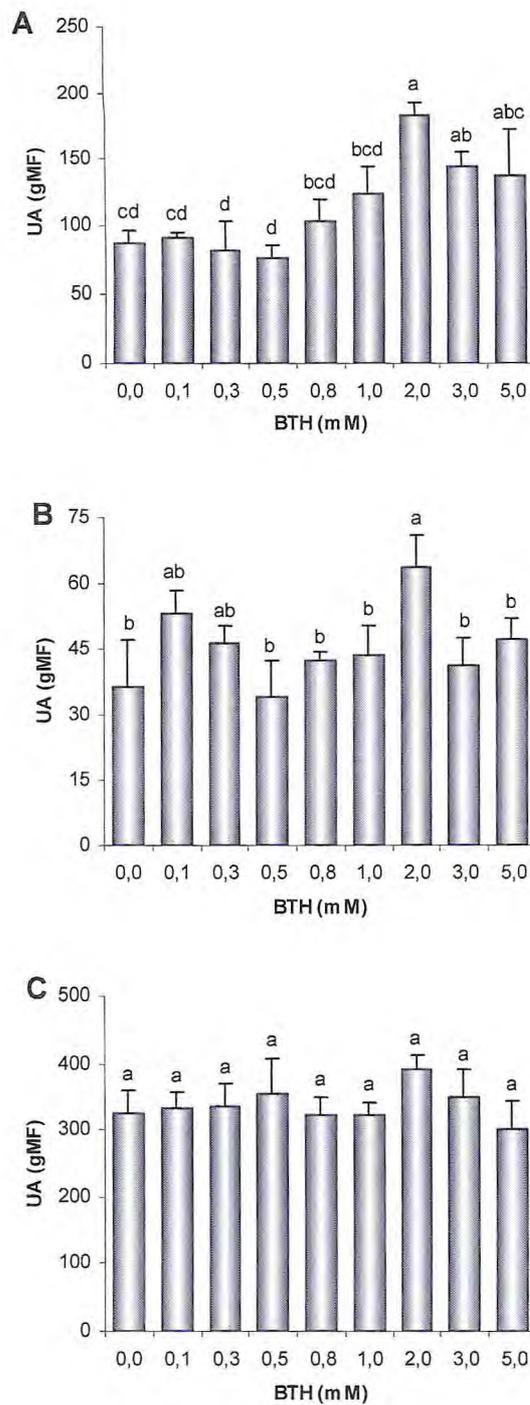


FIGURA 2.8 – Atividade de peroxidase (POX) em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

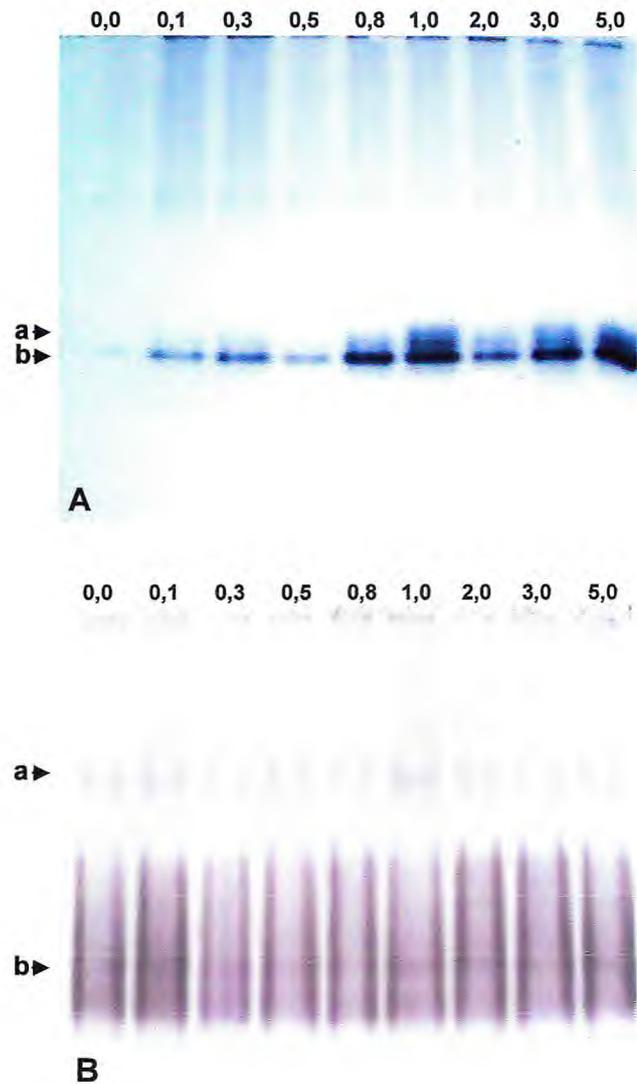


FIGURA 2.9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelado para atividade peroxidásica (POX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e tratado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Setas indicam diferentes isoformas.

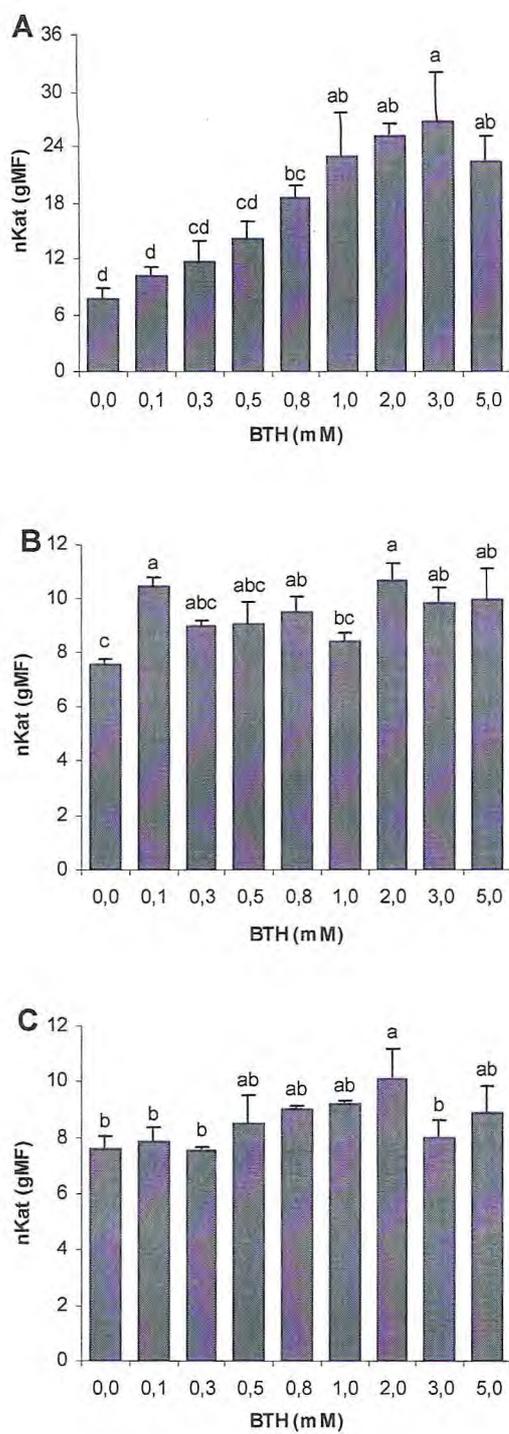


FIGURA 2.10 – Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

#### 2.4.1.4 – Enzimas Envolvidas nas Respostas ao Estresse Oxidativo

As atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), que participam na eliminação de espécies reativas de oxigênio, também foram alteradas com a pulverização da parte aérea de plantas de feijão-de-corda com determinadas concentrações de BTH.

Em folhas tratadas com diferentes concentrações de BTH, foi observado aumento na atividade de CAT já para a concentração de 0,1 mM de BTH, aumento este que permaneceu estatisticamente semelhante para as outras concentrações de BTH usadas, (FIGURA 2.11 A). Em raízes, o BTH parece ter inibido a atividade CAT, à exceção das concentrações de 2,0; 3,0 e 5,0 mM (FIGURA 2.11 B). As maiores inibições da atividade CAT em tecidos radiculares, com médias diferindo significativamente do controle, foram causadas por tratamentos com BTH nas concentrações de 0,8 e 1,0 mM.

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi realizada em gel (12,5 % de acrilamida) apenas para o tecido foliar, órgão alvo da aplicação dos tratamentos. O zimograma permitiu observar a expressão de duas isoformas (a e b) desta enzima, tanto em extratos provenientes de plantas tratadas como de plantas controle. Leve aumento na intensidade destas bandas nos diferentes tratamentos com BTH foi observado, à exceção do tratamento na concentração de 5,0 mM, o qual parece ter inibido a atividade da enzima em suas duas isoformas (FIGURA 2.12).

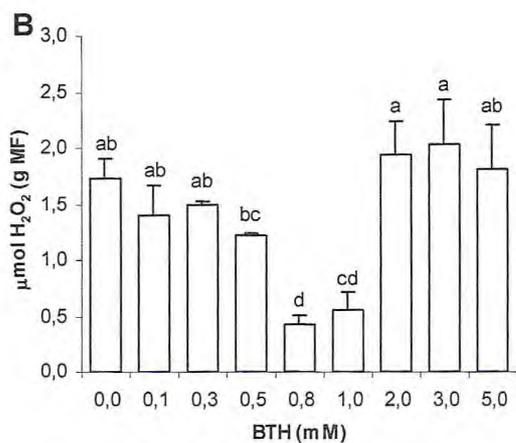
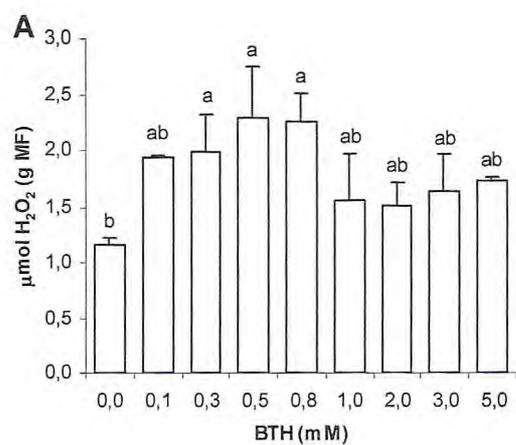


FIGURA 2.11 – Atividade de catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (B) de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos de acordo com o teste-*t* de Student.

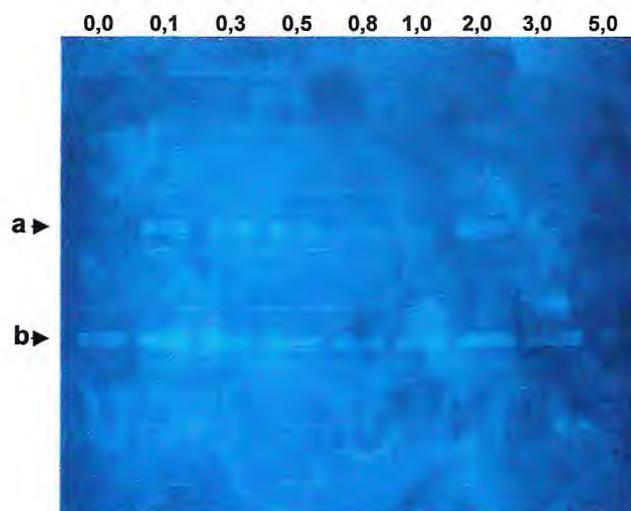


FIGURA 2.12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelado para atividade de superóxido dismutase (SOD) em folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 0,8 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. Setas indicam diferentes isoformas.

## 2.4.2 – Efeito do Tratamento das Sementes com BTH sobre as Atividades Enzimáticas

Este experimento foi conduzido com o propósito de investigar se o tratamento com BTH realizado em sementes alteraria os padrões de atividades das enzimas POX (enzima que participa dos processos de reforço da parede celular), CAT e SOD (enzimas do metabolismo antioxidativo).

### 2.4.2.1 – Peroxidase (POX)

A atividade de POX, monitorada a partir da revelação do padrão de bandas protéicas em gel de poliacrilamida (10%), oriunda dos cotilédones, eixos embrionários, caules, folhas e raízes provenientes de sementes controles (0,0) e tratadas com 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM de BTH, demonstrou que o número de isoformas foi diferente para os diferentes tecidos analisados.

Em tecidos cotiledonares, independente dos tratamentos, a atividade da enzima POX aumentou ao longo do tempo, sendo sua maior atividade evidenciada pelo aumento na intensidade da cor púrpura apresentada pelas bandas das isoformas no tempo de oito DAS (FIGURA 2.13). Em tecidos cotiledonares coletados com 1 DAS, os tratamentos, com exceção de 5,0 mM de BTH, induziram maior atividade enzimática, o que foi evidenciado pela presença de bandas mais intensas (FIGURA 2.13 A). No gel apresentado na FIGURA 2.13 B, referente à atividade peroxidásica dos cotilédones com 2 DAS, foi possível observar inibição da atividade enzimática com os tratamentos, exceto com 5,0 mM que foi semelhante ao controle. O tratamento com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5 mM proporcionou aumento na atividade de POX em cotilédones coletados com 5 DAS. Neste mesmo tempo de coleta, as maiores concentrações de BTH usadas nos tratamentos inibiram a atividade POX (FIGURA 2.13 C). A avaliação feita com 8 DAS em cotilédones demonstrou aumento na atividade desta enzima em todos os tratamentos, sendo que, o tratamento de 0,1 mM ocasionou aumento na atividade de uma das isoformas (d) de POX, diferindo fortemente do controle e dos demais tratamentos (FIGURA 2.13 D).

A atividade de POX, revelada em gel para extratos de eixos embrionários, evidenciou, pelo menos, três isoformas (a, b, c), sendo que duas delas (b, c) foram fortemente induzidas, particularmente aos 1 e 2 DAS, independentemente da concentração de BTH usada (FIGURA 2.14).

Em caule, esta enzima apresentou padrões diferentes quando avaliado o fator tempo, e aos 8 DAS foi quando a maior intensidade das bandas foi verificada (FIGURA 2.15). Aparentemente, pelo menos sete isoformas (a, b, c, d, e, f, g) estão presentes no caule, sendo que algumas delas aumentam de expressão (5 DAS isoformas d, g; 8 DAS isoformas c, g) e outras diminuem (8 DAS b) ou mesmo desaparecem (5 DAS e, f; 8 DAS f) dependendo da concentração de BTH usada. De fato, aos 5 DAS, o tratamento com 1,0 mM de BTH induziu fortemente o aparecimento de uma isoforma de POX (d), que se encontra bastante proeminente no gel, se destacando das demais. Com 8 DAS, a atividade da isoforma, identificada como c foi também fortemente induzida pelo tratamento com BTH, destacando-se das demais por apresentar resposta tipo dose-dependente.

Em tecidos foliares, aos 5 DAS, apenas o tratamento com 0,1 mM de BTH induziu o aparecimento de uma nova isoforma de peroxidase (b), quando comparado ao controle e aos outros tratamentos impostos às sementes de feijão-de-corda (FIGURA 2.16 A). Contudo, aos 8 DAS, foi possível observar a presença desta isoforma mesmo no controle (a). Entretanto, análise mais cuidadosa do gel mostrou que 1,0 mM de BTH causou, aparentemente, indução da atividade desta isoforma, em particular, aos 8 DAS. Por outro lado, tratamento com BTH nas concentrações de 0,3; 0,5; 3,0 e 5,0 mM parece causar inibição da atividade desta isoforma de POX (FIGURA 2.16 B).

Os resultados obtidos em tecidos de raízes de plantas provenientes de sementes tratadas com BTH nas diferentes concentrações discutidas são semelhantes aos obtidos com eixos embrionários, para os dois tempos avaliados. Tanto aumento na atividade de enzimas presentes nos controles (peroxidases constitutivamente expressas) como novas isoformas, foram detectadas em ambos os tecidos, raízes e eixos embrionários (FIGURA 2.17).

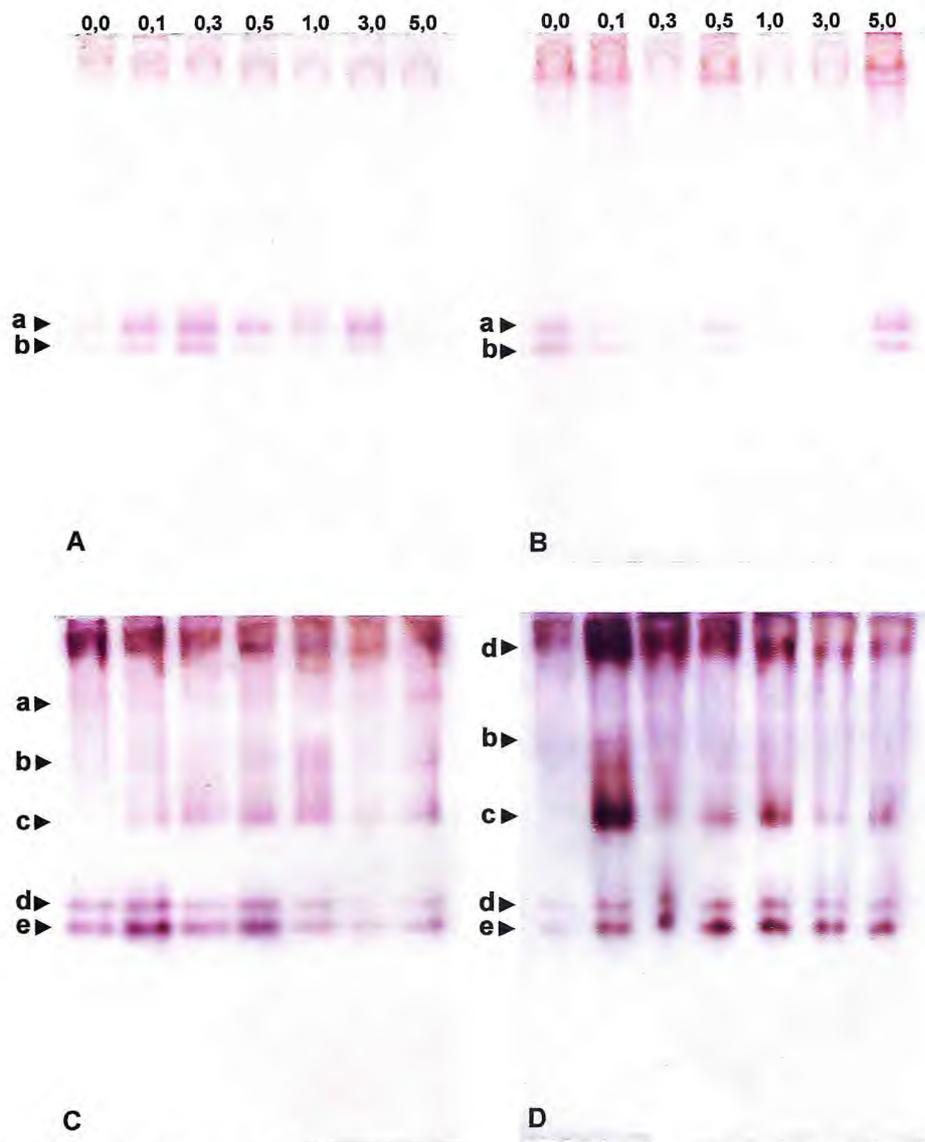


FIGURA 2.13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) revelada para atividade peroxidásica de cotilédones de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A), (B), (C) e (D) correspondem 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

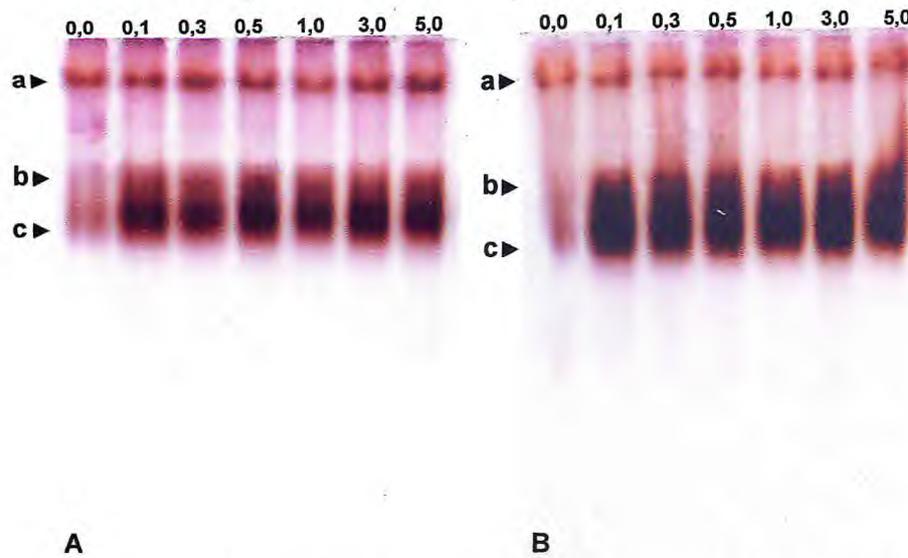


FIGURA 2.14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de eixos embrionários de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 1 e 2 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

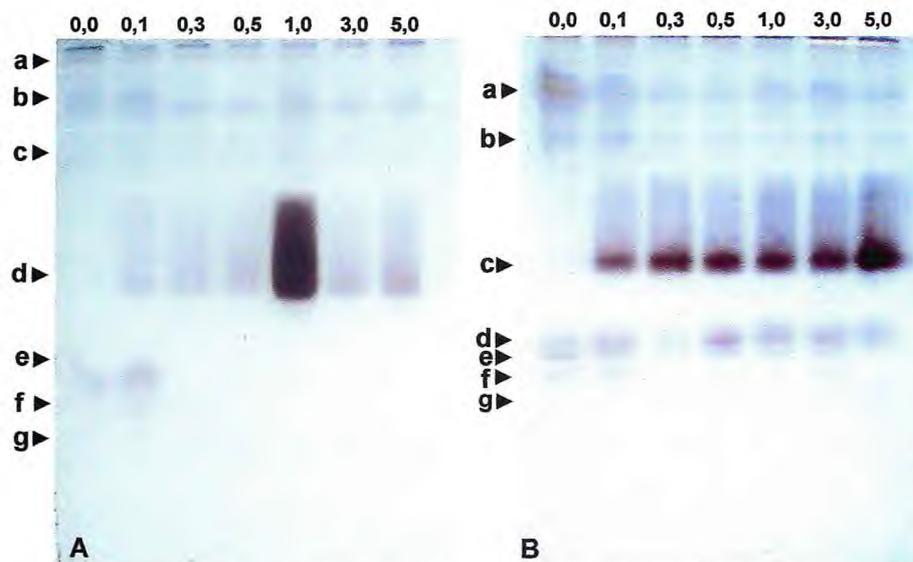


FIGURA 2.15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de caule de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

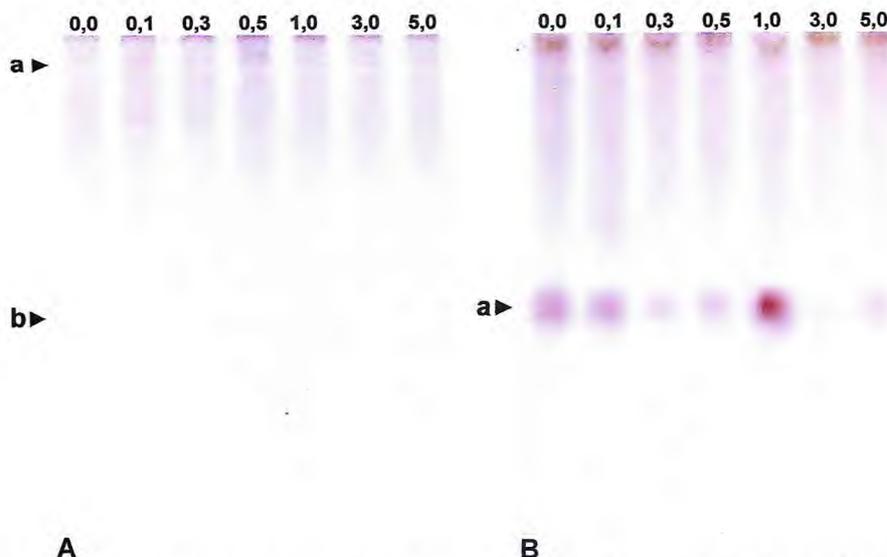


FIGURA 2.16 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

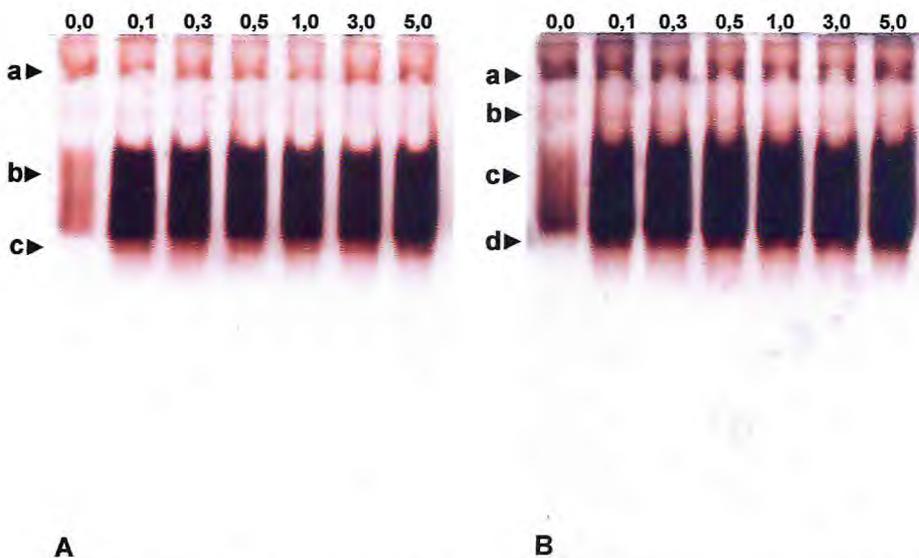


FIGURA 2.17 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), revelada para atividade peroxidásica de extratos totais de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

#### 2.4.2.2 – Catalase (CAT)

A atividade CAT foi observada, em gel de poliacrilamida (7%), como bandas acromáticas sobre gel de fundo azul ou verde escuro. Na maioria dos tecidos avaliados, uma isoforma com atividade de CAT foi observada.

Com 1 DAS ocorreu redução na atividade de CAT cotiledonar de sementes tratadas com BTH nas maiores concentrações (1,0; 3,0 e 5,0 mM) (FIGURA 2.18 A). Porém, aos 2 DAS, nenhuma diferença foi observada para este tecido comparando as atividades em sementes controles e tratadas com BTH (FIGURA 2.18 B). Já aos 5 DAS, a atividade de CAT cotiledonar foi induzida pela imersão das sementes em BTH de forma aparentemente crescente com o aumento da concentração do indutor (FIGURA 2.18 C). Ausência de atividade catalásica nos cotilédones coletados aos 8 DAS foi verificada independente do tratamento com BTH. (FIGURA 2.18 C).

Para eixos embrionários coletados 1 DAS, o tratamento com BTH, nas concentrações de 0,1; 0,3; e 0,5 mM, inibiu a atividade de CAT (FIGURA 2.19 A). Com 2 DAS, a intensidade das bandas diminuiu quando as sementes foram imersas na diferentes concentrações de BTH, exceto para a de 3,0 mM (FIGURA 2.19 B).

No caule, a imersão das sementes em solução de BTH, nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 e 3,0 mM, foi capaz de aumentar, discretamente, a atividade de CAT, aos 5 DAS (FIGURA 2.20 A), em relação àquela apresentada pelo controle. Mas, aos 8 DAS, houve diminuição acentuada de atividade, inclusive com desaparecimento de isoformas em algumas concentrações de BTH usadas (FIGURA 2.20 B).

O zimograma de tecidos foliares para CAT mostrou que houve aumento na intensidade de bandas 5 DAS (b, c), em decorrência dos tratamentos com BTH (FIGURA 2.21 A). Diferentemente, aos 8 DAS, não houve diferenças detectáveis entre controle e os tratamentos (FIGURA 2.21 B).

Em raízes, uma fraca atividade de CAT foi observada nos dois tempos de análises, sendo o tempo de 8 DAS o que apresentou menor intensidade das bandas (FIGURA 2.22 A e B).

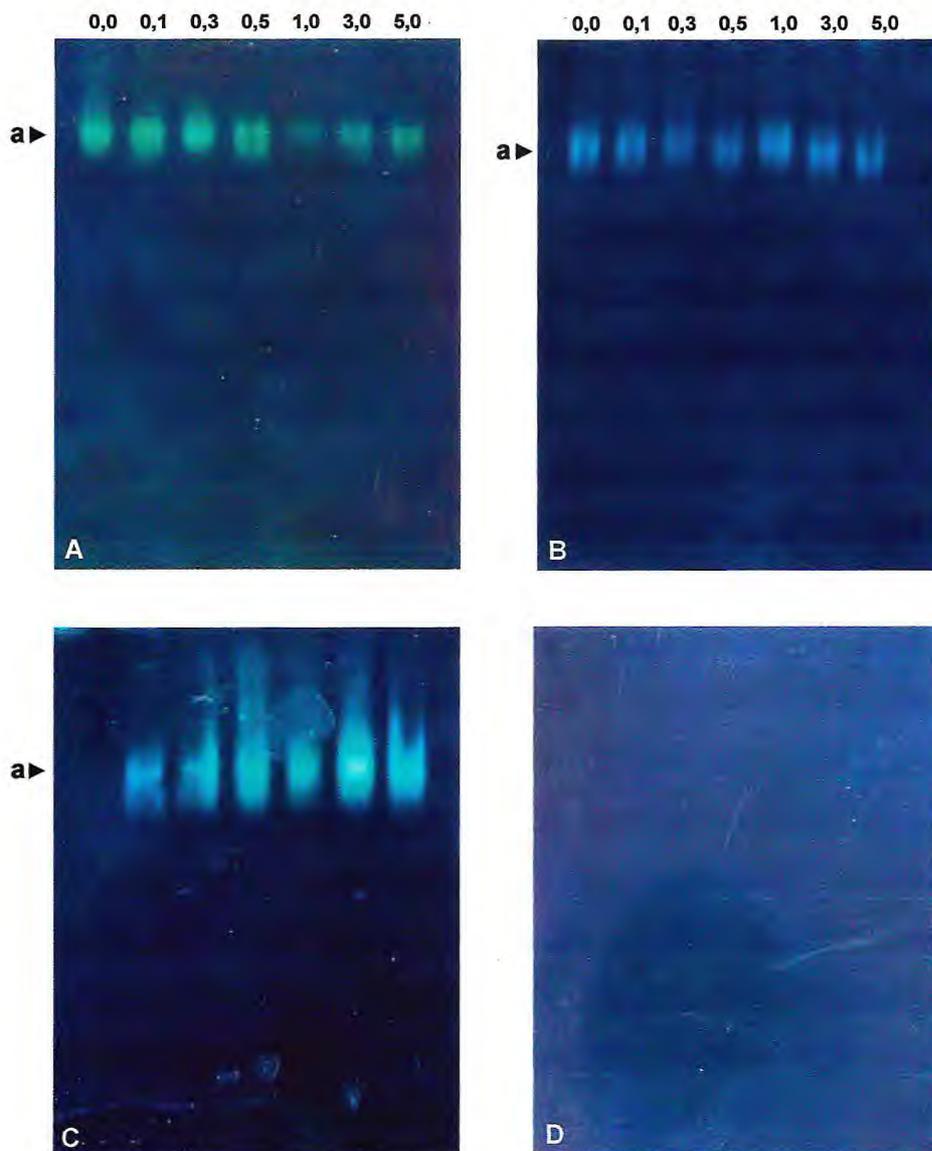


FIGURA 2.18 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica em extratos totais de cotilédones de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A), (B), (C) e (D) correspondem a 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

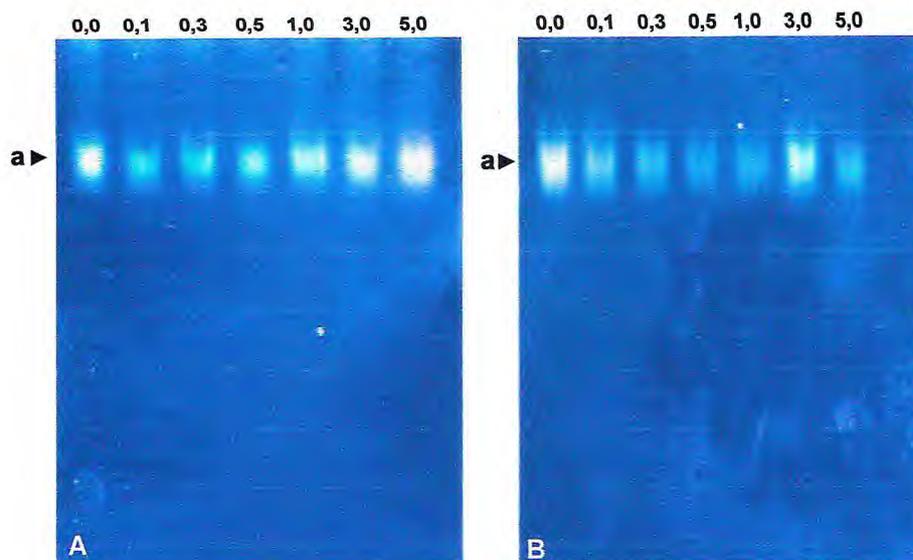


FIGURA 2.19 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica em extratos totais de eixos embrionários de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 1 e 2 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

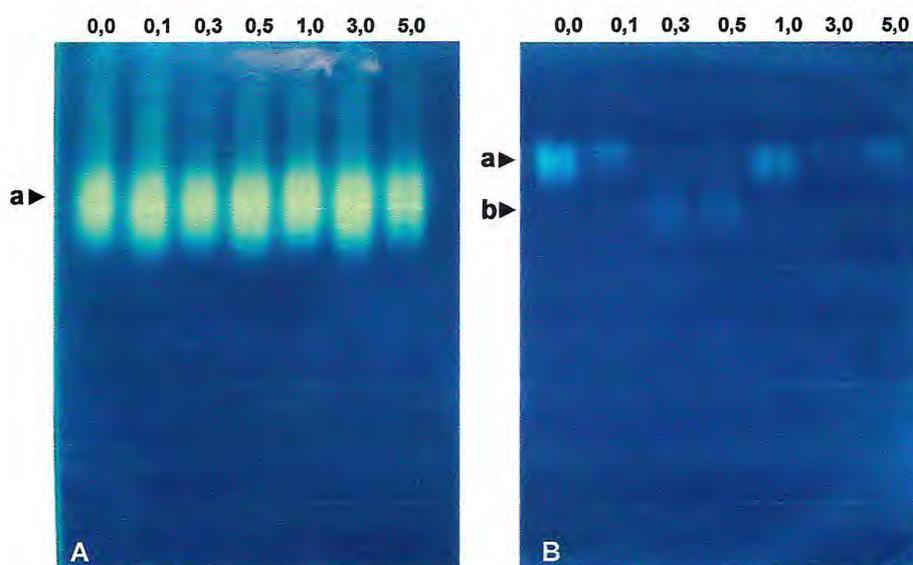


FIGURA 2.20 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica em extratos totais de caule de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

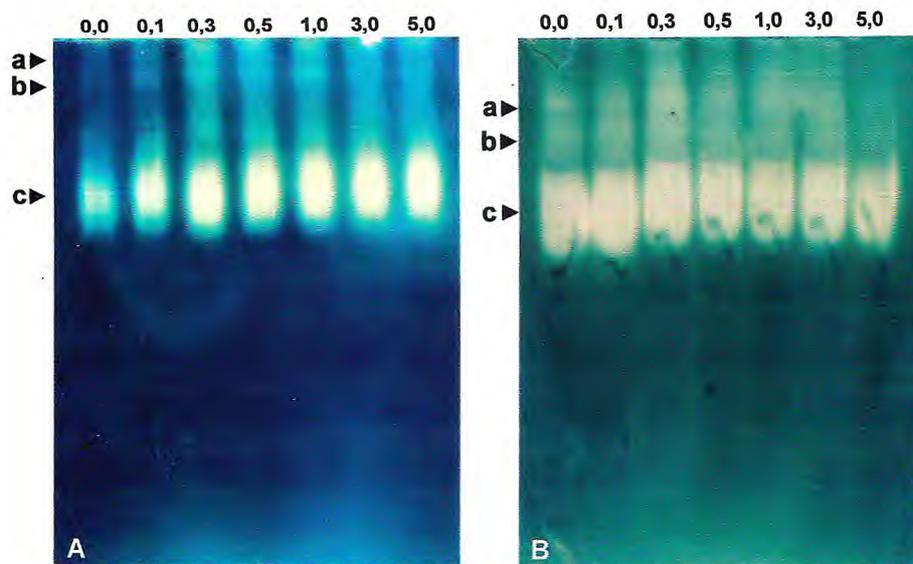


FIGURA 2.21 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica de extratos totais de folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

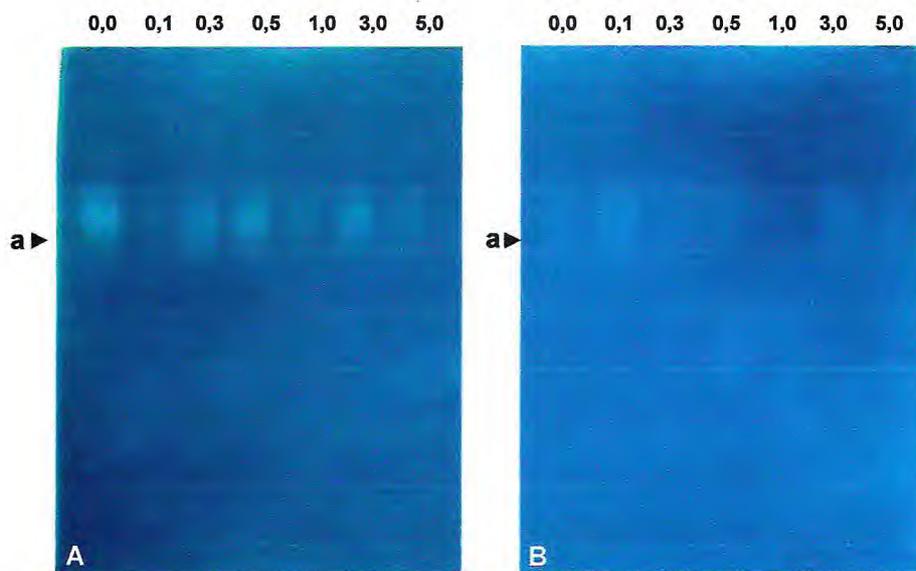


FIGURA 2.22 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%), revelada para atividade catalásica de extratos totais de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

#### 2.4.2.3 – Superóxido Dismutase (SOD)

As avaliações referentes à atividade de SOD foram feitas em gel de poliacrilamida na concentração de 12,5%. As atividades e padrões de isoenzimas se revelaram como bandas acromáticas em fundo roxo.

Os tecidos cotiledonares apresentaram diferentes padrões de bandas de acordo com os tempos de coleta. Nos períodos de 1 e 2 DAS, quatro isoformas foram evidenciadas, ao passo que aos 5 e 8 DAS, apenas 3 isoformas foram reveladas. Os tratamentos não diferiram entre si e nem dos controles quando a atividade da SOD foi avaliada para 1 e 5 DAS (FIGURA 2.23 A e C). Entretanto, quando as análises foram feitas nos tecidos coletados com 2 DAS, diferentes atividades apresentadas pelas isoformas de SOD foram observadas. De fato, os tratamentos com 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM induziram diminuição de atividade da isoforma b e induziram aumento na atividade da isoforma c (FIGURA 2.23 B). Aos 8 DAS, todas as concentrações de BTH usadas induziram a atividade de SOD para as três isoformas reveladas, em comparação com o controle (FIGURA 2.23 D).

Quatro isoformas de SOD foram evidenciadas nos eixos embrionários de feijão-de-corda, contudo, nenhuma diferença no padrão de bandas foi observada pelo tratamento com BTH nas diferentes concentrações e nos dois tempos de coleta (FIGURA 2.24).

Em caule, no tempo de coleta de 5 DAS, tratamentos e controle apresentaram quatro isoformas (FIGURA 2.25 A), enquanto que em tecidos coletados com 8 DAS, cinco isoformas foram reveladas, sendo três mais proeminentes (a, c, e) (FIGURA 2.25 B). Nenhuma alteração na atividade SOD em caule, em decorrência dos tratamentos com BTH, foi verificada nos dois tempos de coleta (FIGURA 2.25).

Nas folhas, quatro isoformas com atividade de SOD foram reveladas, mas nenhuma diferença no padrão dessas isoformas com a aplicação dos tratamentos foi verificada nos dois tempos avaliados (FIGURA 2.26).

Em raízes do controle, três isoformas de SOD foram observadas (a, c, d), sendo que os tratamentos foram capazes de induzir a expressão de outra isoforma (b), perfazendo nos tratamentos quatro isoformas reveladas nos dois tempos avaliados. Com 5 e 8 DAS os tratamentos com BTH foram capazes de induzir a expressão de uma isoforma (b), não revelada para raízes controle (FIGURA 2.27 B), além de, aumentar a atividade duas isoformas com 5 DAS (a, c) (FIGURA 2.27 A).

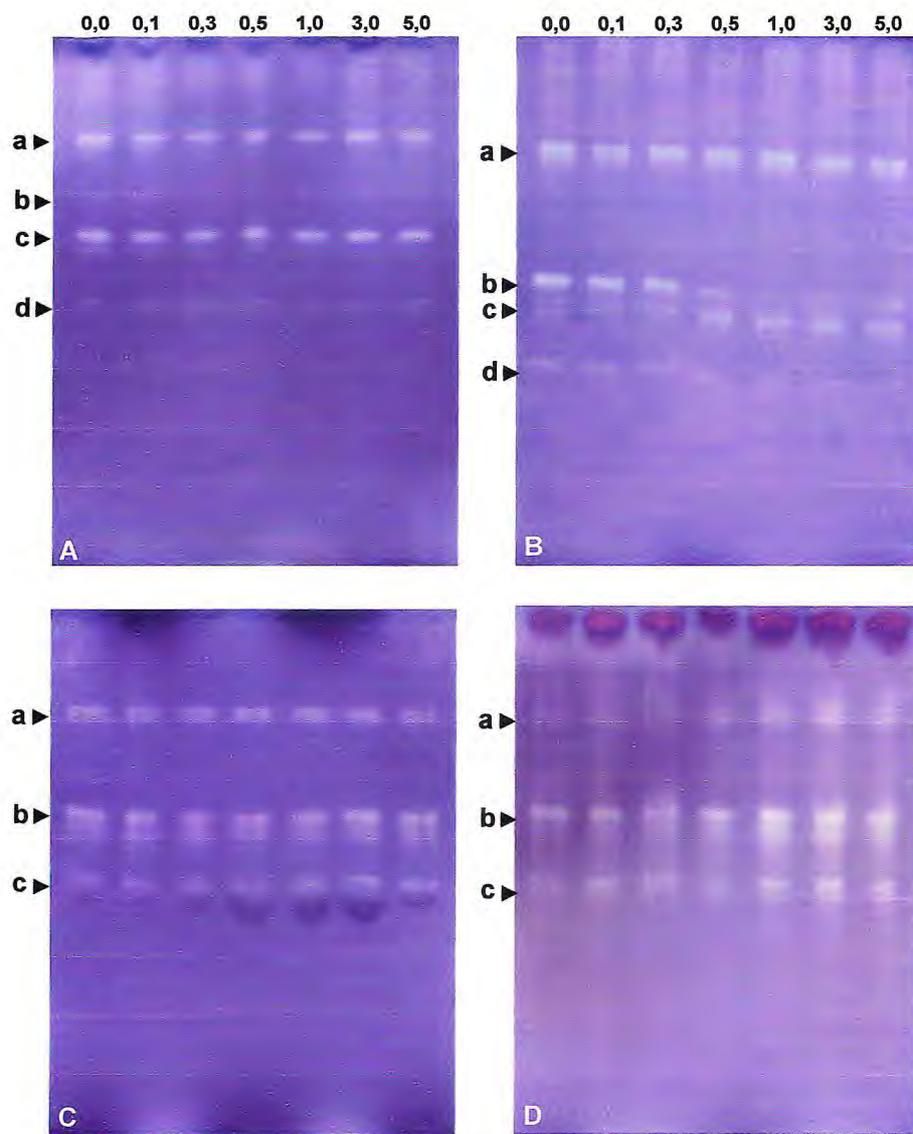


FIGURA 2.23 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de cotilédones de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A), (B), (C) e (D) correspondem a 1, 2, 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

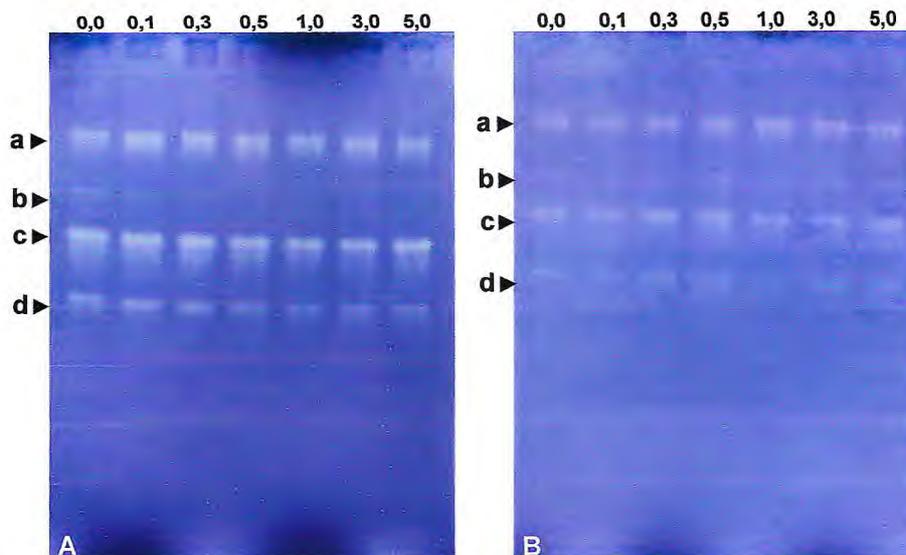


FIGURA 2.24 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de eixos embrionários de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem a 1 e 2 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

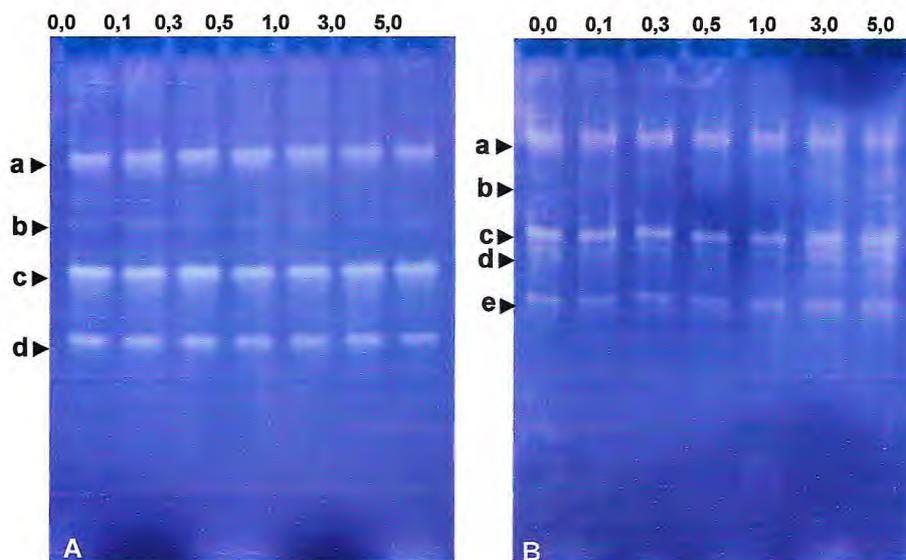


FIGURA 2.25 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de caule de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem a 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

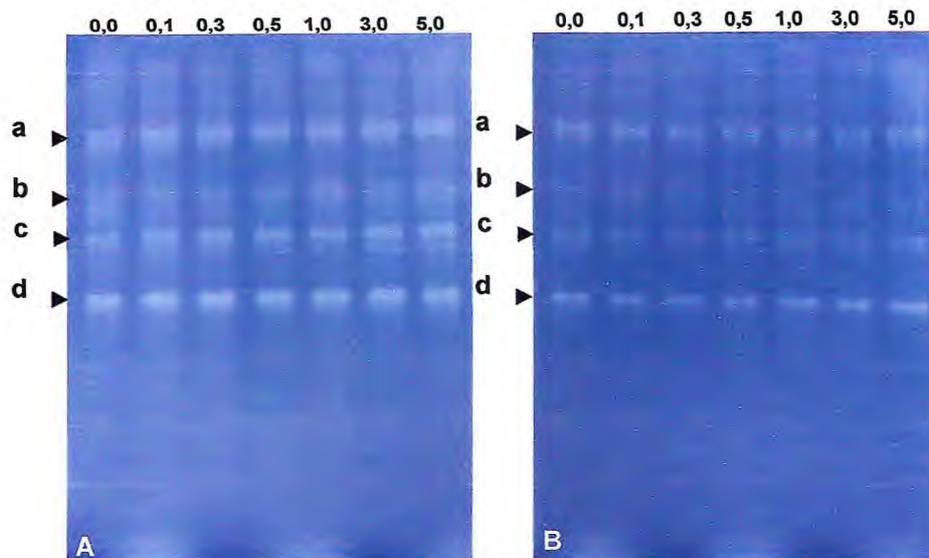


FIGURA 2.26 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de folhas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem a 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

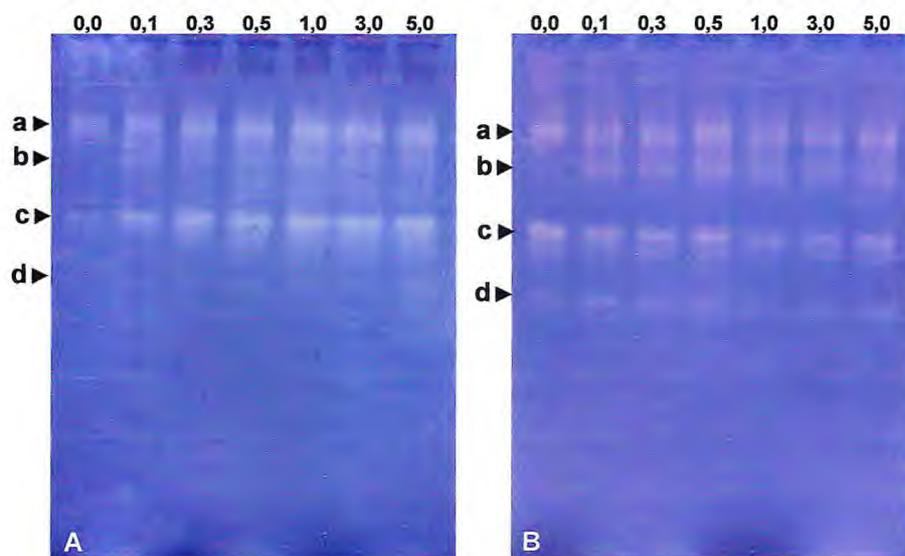


FIGURA 2.27 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), revelada para atividade superóxido dismutase de extratos totais de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundo de sementes controle (0,0) e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem a 5 e 8 dias após semeadura (DAS), respectivamente. Setas indicam diferentes isoformas.

### 2.4.3 – Acúmulo de Lignina em Folhas de Feijão-de-corda Tratadas com BTH

Para avaliar se o BTH era capaz de alterar os teores de lignina em feijão-de-corda, folhas provenientes de plantas que foram pulverizadas na parte aérea e folhas de plantas provenientes de sementes tratadas com BTH pelo método da imersão foram avaliadas quanto ao acúmulo de lignina. As avaliações foram feitas em períodos distantes após os tratamentos com BTH devido à necessidade de tempo para que ocorressem síntese e acúmulo de lignina nos tecidos.

Em folhas primárias, a aplicação foliar de BTH, nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 e 2,0 mM diminuiu a lignificação do tecido coletado 10 dias após tratamento (DAT). Para o tempo de coleta de 15 DAT, resultados semelhantes foram observados. Neste tempo, os tratamentos de 0,3; 0,5; 1,0 mM diminuíram os teores de lignina (FIGURAS 2.28 A e B).

Em folhas secundárias, o BTH foi capaz de induzir a lignificação nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM, sendo os resultados semelhantes para os tempos de 10 e 15 DAT (FIGURAS 2.29 A e B).

Em plantas cultivadas em vasos contendo areia como substrato e oriundas das sementes tratadas com BTH, nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM, as folhas secundárias, coletadas 30 dias após a semeadura (DAS), apresentaram aumento nos teores de lignina. Este resultado demonstrou que o tratamento das sementes com BTH foi capaz de induzir o acúmulo de lignina durante o estabelecimento da planta, em tecidos não tratados, de modo sistêmico.

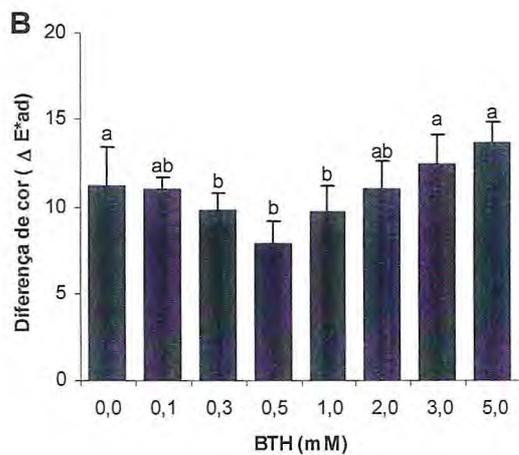
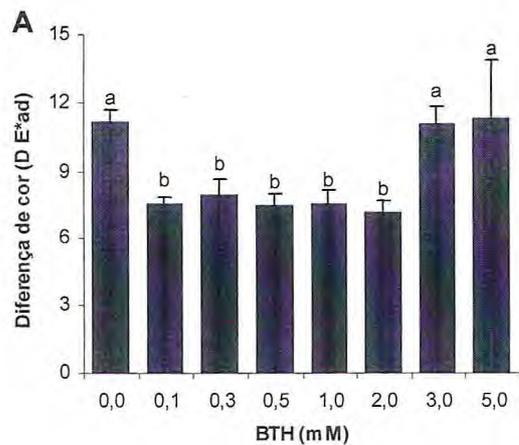


FIGURA 2.28 – Concentração de lignina em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem a folhas primárias coletadas 10 e 15 dias após tratamento (DAT), respectivamente. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

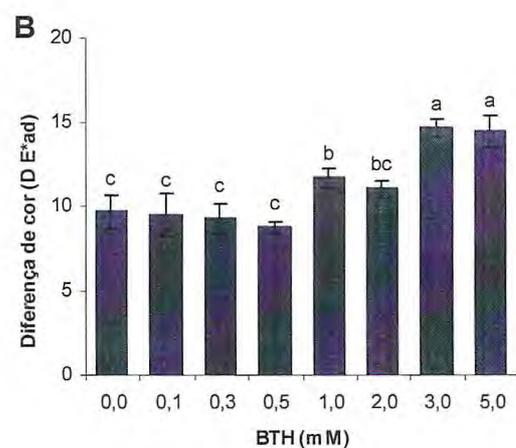
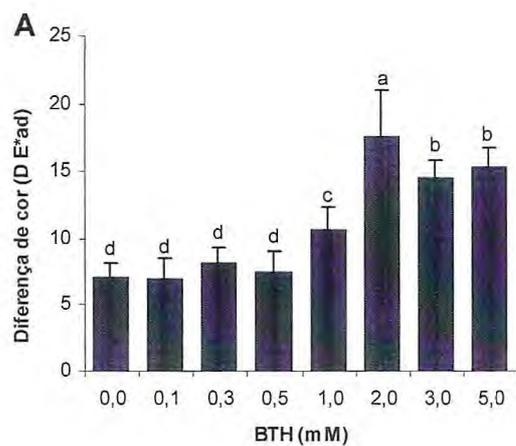


FIGURA 2.29 – Concentração de lignina em folhas secundárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, controle (0,0) e pulverizado com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. (A) e (B) correspondem a folhas secundárias coletadas 10 e 15 dias após tratamento (DAT), respectivamente. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

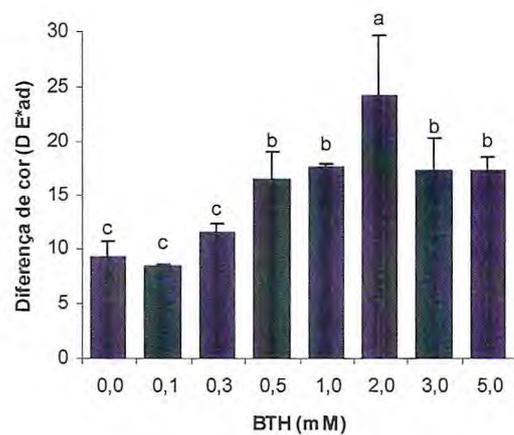


FIGURA 2.30 – Concentração de lignina em folhas secundárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, oriundas de sementes controle e previamente imersas em BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM. As folhas foram coletadas 30 dias após tratamento (DAS). Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student.

## 2.5 – DISCUSSÃO

Numerosos mecanismos induzidos contribuem para potencializar a proteção natural de plantas contra patógenos. O ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH) foi apresentado como um produto indutor da SAR, sendo, então, efetivo em proteger plantas contra diferentes patógenos (Görlach *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996). Na via de transdução dos genes SAR, o BTH age semelhante ao ácido salicílico (SA) um elicitor endógeno (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990) de genes SAR que codificam para proteínas denominadas de PR-proteínas (van Loon e van Strein, 1999).

Apesar das constantes pesquisas com BTH, referentes à indução dos mecanismos de defesa das plantas que levam a resistência à doença, poucos trabalhos são conhecidos com feijão-de-corda. Devido à grande importância do feijão-de-corda para o Nordeste Brasileiro, este trabalho procurou avaliar o uso do BTH como elicitor dos mecanismos de defesa dessa leguminosa.

Três vertentes principais do mecanismo de defesa de plantas foram analisadas neste trabalho. Inicialmente, atividades das enzimas envolvidas na síntese do biopolímero lignina, peroxidase e fenilalanina amônia liase, bem como os teores de lignina foram avaliados. Em outra abordagem, atividades das enzimas relacionadas com a remoção de espécies reativas de oxigênio, catalase e superóxido dismutase, foram alvos dos estudos. Por último, foi analisada a capacidade do BTH em alterar a expressão da proteína relacionada à patogênese,  $\beta$ -1,3-glucanase. Em todos os casos, tecidos de diferentes órgãos provenientes de plantas de feijão-de-corda tratadas com BTH nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM, por dois métodos diferenciados de aplicação do BTH, foram utilizados nas análises.

Cada um dos três principais eventos acima analisados: i) estruturação e reforçamento da parede celular, ii) controle no balanço de ROS e iii) ativação de PR-proteínas são constituintes fundamentais da resposta de defesa de plantas contra invasores sendo relatados, em vários trabalhos, por serem efetivos contra a ação de diferentes patógenos e, também, como sendo passíveis de serem desencadeados por elicitores sintéticos, incluindo o BTH.

Os tratamentos com elicitores são realizados em diferentes tecidos e com modos de aplicação variados, o encharcamento do solo, pulverização da parte aérea

de plantas e embebição de sementes são alguns dos exemplos (Lopez e Lucas, 2002). No presente trabalho, dois modos de aplicação do BTH, consistindo ambos em: i) Pulverização foliar em plantas com 10 dias após plantio e ii) Tratamento de sementes por embebição por período de 24 horas, foram avaliados. Como já citado, alterações na quantidade de proteínas solúveis totais, nas atividades das enzimas analisadas, bem como nos teores de lignina foram observadas nos dois modelos de tratamento.

### 2.5.1 – Proteínas Solúveis Totais

O BTH, nas concentrações de 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM foi capaz de induzir aumento na quantidade de proteínas solúveis totais em tecidos foliares de feijão-de-corda. Entretanto, em caules e raízes, aumentos do tipo dose-dependente não foram observados. Diferença na quantidade de proteínas em virtude da pulverização com BTH em plantas de feijoeiro também foi observada por Soares *et al.* (2004), onde a quantidade de proteínas solúveis totais foi maior no caule das plantas pulverizadas do que nas não-pulverizadas, porém não diferiu nas folhas.

Apesar de o BTH, em concentrações acima de 0,3 mM, ter causado aumento nos níveis de proteínas solúveis totais de folhas de feijão-de-corda, diferenças nos perfis eletroforéticos destas proteínas não puderam ser visualizados. Resultados semelhantes foram obtidos para caules e raízes.

### 2.5.2 – Fenilalanina Amônia Liase (PAL)

A atividade da PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides. Essa enzima atua catalisando a conversão do aminoácido fenilalanina em ácido-transcinâmico, passo este que precede a formação de compostos como fitoalexinas, isoflavonóides e lignina (Nakazawa *et al.*, 2001).

Os tratamentos com BTH, na maioria das concentrações aplicadas, não alteraram a atividade desta enzima nos diferentes tecidos analisados, sendo que, apenas a aplicação de BTH nas concentrações de 2,0 e 3,0 mM em folhas, 0,5 mM

em caules e 0,3 mM em raízes causaram um aumento desta atividade. Gondim (2006), analisando a expressão desta enzima em plantas de meloeiro tratadas com BTH nas concentrações de 0,3; 0,5 e 1,0 mM (i.a.), não observou diferenças. Latunde-Dada e Lucas (2001), estudando também feijão-de-corda, demonstraram ser eficientes o tratamento com BTH para a redução da infecção causada pelo fungo *Colletotrichum destructivum*. Esta resistência foi associada ao aumento rápido e transiente da enzima (PAL) em tecidos tratados, o qual levaria a um subsequente acúmulo de compostos da via dos fenilpropanóides envolvidos no mecanismo de defesa vegetal. De modo semelhante, Cavalcanti (2005) observou aumento na atividade desta enzima quando tratou plantas de tomateiro com BTH.

Estudos da participação da enzima PAL na indução de resistência por BTH em frutos pós-colheita apresentam diferentes respostas. Liu *et al.* (2005) observaram que o tratamento com 1,05 mM BTH protegeu frutos de pêsegos contra o fungo *Penicillium expansum* e induziu aumento na atividade PAL, diferente dos resultados de Gondim (2006), que o tratamento com 2 mM de BTH não foi capaz de proteger frutos de melão contra o fungo *Fusarium pallidoroseum* e nenhuma diferença na atividade PAL foi observada entre plantas controles e tratadas. Estes resultados, aparentemente, demonstram o envolvimento desta enzima no mecanismo de defesa do fruto. Stadnik e Buchenauer (2000) confirmaram a participação da PAL no mecanismo de defesa de plantas quando utilizou um inibidor da atividade PAL o qual suprimiu a resistência promovida por BTH em trigo contra *Blumeria graminis*.

### 2.5.3 – PR-Proteínas

#### 2.5.3.1 – Peroxidase (POX)

A POX é uma PR-proteína constantemente estudada em interações plantas/patógeno, devido a sua participação na formação de compostos estruturais de reforçamento da parede celular como a lignina, em oposição à entrada de patógenos (van Loon e van Strien, 1999). O aumento na atividade desta enzima em tecidos vegetais pode surgir em decorrência do contato com patógenos, agressões mecânicas, tratamento químico entre outros (van Loon *et al.*, 2006).

Fernandes (1998) observando o aumento na atividade desta enzima em plantas de feijão-de-corda tratadas com ácido salicílico, sugeriu sua participação no mecanismo de resistência desta planta. Confirmando esse resultando, os dados aqui apresentados mostram aumento da atividade POX em tecidos foliares em decorrência do tratamento das plantas com BTH. Em caule apenas plantas tratadas com 2,0 mM de BTH apresentaram aumento na atividade de POX e em tecidos de raízes esta atividade não foi alterada. Estes resultados sugerem que a indução da atividade desta enzima não ocorreu de forma sistêmica, ou ainda, o tempo de avaliação não contemplou essa indução. Diferentemente, em tecidos provenientes de plantas cujo tratamento foi realizado nas sementes, foram observadas alterações nos diferentes tecidos. Estas alterações consistiram tanto no aumento de expressão de isoformas naturalmente constitutivas como na indução de novas isoformas. Aumentos marcantes na atividade desta enzima foram observados em tecidos do eixo embrionário e de raízes.

Resultado de aumento da atividade POX, em decorrência da aplicação de BTH foi observado por Rodrigues *et al.* (2006) também estudando feijão-de-corda. Em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), plantas pulverizadas com BTH também apresentaram aumento na atividade POX, tanto em folhas, como em caule (Soares *et al.*, 2004).

Soylu *et al.* (2003) consideraram esta enzima como marcadora de resistência quando observaram que o tratamento da parte aérea de plantas de tomateiro com BTH aumentava progressivamente a atividade POX e conferia resistência a *Clavibacter michiganensis*. Cavalcanti e colaboradores (2006) também observaram aumento na atividade desta enzima em plantas de tomateiro tratadas com BTH. Os dados de atividade obtidos em espectrofotômetro foram confirmados com realização de zimogramas, onde ficaram evidenciados tanto aumentos quantitativos como qualitativos decorrentes do tratamento com BTH, na expressão dessa enzima. Gondim (2006) e Baysal e Zeller (2004), tratando meloeiro e macieira, respectivamente, observaram aumento na atividade POX em decorrência da aplicação foliar de BTH.

O tratamento com BTH feito em frutos de pêssego conferiu resistência ao fungo *Penicillium expansum* e aumento da atividade POX (Liu *et al.*, 2005), diferentemente, frutos de melão não foram protegidos e atividade desta enzima não foi alterada pelo tratamento com BTH (Gondim, 2006). Semelhante aos resultados

encontrados para a enzima PAL, a POX também participa no mecanismo induzido de resistência a fungos. Em concordância, Malolepsza (2006) acredita que o aumento na atividade POX foi elemento importante para indução de resistência por BTH em tomateiro ao fungo *Botrytis cinerea*.

Além do BTH, tratamentos com outros elicitores como ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA) e quitosana em *Phaseolus vulgaris* (Rodrigues *et al.*, 2006), Ecolife<sup>®</sup>, uma formulação aquosa heterogênea contendo polifenóis, flavonóides, fitoalexinas e ácidos orgânicos, em tomateiro (Cavalcanti *et al.*, 2006) e extratos de *Hedera helix* em macieira, foram capazes de induzir aumento da atividade peroxidásica.

#### 2.5.3.2 – $\beta$ -1,3-glucanase

Proteínas pertencentes à família PR-2 do grupo das PR-proteínas,  $\beta$ -1,3-glucanases são enzimas normalmente monoméricas, com massa molecular de 25 a 35 kDa, que catalisam a hidrólise de  $\beta$ -1,3-glucanos, componentes abundantes da parede celular de fungos. Essas enzimas apresentam importante papel na resposta de defesa de plantas a patógenos, mas, também, estão envolvidas com vários processos fisiológicos e de desenvolvimento em plantas, como a germinação de pólen, amadurecimento de frutos e mobilização de produtos de armazenamento do endosperma de sementes, processo essencial para a germinação. Além de atuarem na interação planta/patógeno,  $\beta$ -1,3-glucanases também são induzidas quando as plantas são submetidas à injúria, frio, ozônio e radiação ultravioleta (Hoffmann-Sommergruber, 2002).

A atividade da enzima GLU aumentou em tecidos de folhas e caules os quais entraram diretamente em contato com o BTH durante sua aplicação. Em raízes, tecido onde o tratamento não foi diretamente aplicado, apenas aquele de 2,0 mM de BTH foi capaz de induzir aumento.

Indução sistêmica da atividade desta enzima foi observada por Owen *et al.* (2002), com aplicação de BTH em folhas de videira, causando aumento na atividade GLU em folhas e raízes nos diferentes tempos avaliados. Folhas de meloeiro também apresentaram aumento na atividade GLU quando tratadas com BTH nas concentrações de 0,3; 0,5 e 1,0 mM (Gondim, 2006)

Mamoeiro (*Carica papaya*), em estudo sobre a indução de resistência com BTH contra *Phytophthora palmivora*, apresentou aumento na atividade GLU em folhas duas horas após a aplicação de 100 mM de BTH, sendo que, aos 10 dias após tratamento, a atividade desta enzima retornou ao nível basal (Zhu *et al.*, 2003). Em tomateiro tratados com BTH a atividade GLU esteve aumentada em todo o tempo do experimento (1, 4, 8, 12, 24 e 48 horas após tratamento), quando comparada à atividade de plantas não-tratadas (Cavalcanti, 2005).

#### 2.5.4 – Enzimas Envolvidas no Estresse Oxidativo

##### 2.5.4.1 – Catalase (CAT)

Nos vegetais, tal como em animais, processos bioquímicos naturais, interações com patógenos e, mais especificamente em plantas, tratamento com elicitores podem promover aumento na concentração de ROS nas células (Garcia-Limones *et al.*, 2002; Laloi *et al.*, 2004). Entretanto, mecanismos de eliminação dessas moléculas foram desenvolvidos pelas plantas a fim de minimizar seus efeitos tóxicos sobre os tecidos onde estas espécies reativas são acumuladas. CAT é uma das enzimas que fazem parte deste metabolismo antioxidativo convertendo peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Siegel, 1993).

Em tecidos foliares a atividade CAT foi aumentada com os tratamentos nas concentrações de 0,3; 0,5 e 0,8 mM de BTH. As concentrações mais altas de BTH, 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM, não alteraram a atividade dessa enzima. Por outro lado, os tecidos radiculares apresentaram queda na atividade quando plantas foram tratadas com as concentrações de 0,8 e 1,0 mM de BTH. Estes dados mostram que o BTH foi capaz de alterar a atividade CAT em tecidos distantes do local de aplicação.

Tratamento das sementes induziu, na maioria dos tecidos, inibição na atividade CAT. Decréscimo na atividade CAT foi observada em vários trabalhos, quando plantas foram tratadas com SA e seus análogos (Wendehenne *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997; Wojtaszek, 1997; Cavalcanti, 2005).

Tanto a inibição da CAT quanto a indução das PR-proteínas, POX e GLU, foram observadas neste trabalho. A inibição da catalase por meio do tratamento com

ácido salicílico e seus análogos como o BTH, por exemplo, parece contribuir para o acúmulo de ROS que poderão atuar no desenvolvimento da resposta hipersensitiva e, conseqüentemente, na SAR (Wu *et al.*, 1997; Wojtaszek, 1997; Mlísková, 2004). Este parece ser um mecanismo de defesa induzido por SA e seus análogos contra patógenos, que dependem de células vivas para seu estabelecimento e colonização.

#### 2.5.4.2 – Superóxido Dismutase

Leve aumento na intensidade de bandas reveladas para atividade SOD foi observado em folhas tratadas com BTH. Já o tratamento realizado em sementes, pouco modificou o padrão de expressão desta enzima. Alterações no número e na atividade de isoformas desta enzima só foram observadas em tecidos cotiledonares 2 e 8 DAS e em tecidos radiculares 5 e 8 DAS.

Gondim (2006) em análise por zimograma não observou diferenças na expressão de isoformas de SOD em frutos tratados com 2,0 mM de BTH. No entanto, alterações no padrão de expressão em tecidos foliares de meloeiro tratados com 0,3; 0,5 e 1,0 mM de BTH foram ressaltadas.

A atividade SOD foi reduzida em folhas de tomateiro em resposta ao tratamento com BTH (Cavalcanti, 2005).

#### 2.5.5 – Lignina

Defesas mecânicas são requeridas por plantas, para que estas possam resistir a pressões ambientais e aos constantes ataques de patógenos e herbívoros (Lucas *et al.*, 2000). A lignificação é um processo de defesa caracterizado 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 reforça a idéia de que este processo tem papel crucial na defesa vegetal (Stadnik e Buchenauer, 2000; Franceschi *et al.*, 2005; Valentines *et al.*, 2005).

Dez e quinze dias após os tratamentos, aumentos no conteúdo de lignina foram observados em folhas primárias de feijão-de-corda tratadas com BTH nas

concentrações de 3,0 e 5,0 mM. Diferentemente, concentrações menores de BTH causaram leve diminuição nos teores de lignina. Considerável acúmulo de lignina foi observado em folhas secundárias de feijão-de-corda tratadas com BTH nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM nos dois tempos analisados. Resposta semelhante foi observada em folhas secundárias provenientes de plantas cujas sementes foram tratadas com BTH, sendo que o tratamento de 0,5 mM de BTH já mostrou diferenças de acúmulo de lignina, quando comparado ao controle.

Tendo em vista a participação das enzimas PAL e POX nas vias de biossíntese de lignina e levando em consideração os aumentos nas atividades destas enzimas em tecidos foliares, decorrentes do tratamento com BTH, é possível especular ou hipotetizar que, o acúmulo de lignina em folhas secundárias, apesar de temporalmente dissociado, possa estar correlacionado com os aumentos nas atividades destas enzimas.

O tratamento foliar de plantas de trigo com quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina e proposto como elicitador de reações de defesa, foi capaz de induzir significativa acumulação de lignina, sendo esse acréscimo relacionado ao aumento da atividade da enzima peroxidase (Vander *et al.*, 1998).

## 2.6 – CONCLUSÃO

Neste trabalho, os dois modos de aplicação do BTH empregados em plantas de feijão-de-corda causaram alterações tanto qualitativas como quantitativas das enzimas avaliadas e induziram acúmulo de lignina em folhas secundárias. Esses resultados sugerem que o indutor em estudo ativa os mecanismos da SAR, da resposta antioxidativa e do reforçamento da parede celular e sua utilização pode levar a indução de resistência contra patógenos. 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 estratégia para aumentar a resistência do feijão-de-corda contra a gama (diversidade) de patógenos que ataca esta cultura.

## 2.7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.D., PRASAD, T.K., STEWART, C.R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedling. **Plant Physiology** 109 (4), 127-1257.
- ANFOKA, G.H. (2000). 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** 19, 401-405.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. **Science** 276, 726–733.
- BARRETO, A.L.H. (2005). Estratégia de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc & Magnus) Briosi & Cav.] e *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] em respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza-CE.
- BAYSAL, O., ZELLER, W. (2004). Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 65, 305–315.
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8, 93-99.
- BOLLER, T. (1993). Biochemical analysis of chitinases and  $\beta$ -1,3 -glucanases. *in*: **Molecular Plant Pathology**. S.J. GURR, M. J. MCPHERSON, and D.J. BOWLES, eds. IRL Press, New York, 23-29.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254.

BRASIL; Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: DNDV/CLAV, v. 12, p. 395, 1991.

BUCHANAN, M., GRUSSEM, W., JONES, R. (2000). Biochemistry e Molecular Biology of Plants. **Editora American Society of Plant Physiologists**. Rockville USA, 1367p.

CARDOSO, B.B. (2000). Fixação biológica de nitrogênio em plantas de feijão-de-corda inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. na presença de diferentes níveis de salinidade. **Tese de Doutorado**. Fortaleza, UFC.

CARUSO, C., CHILOSI, G., CAPORALE, C., LEONARDI, L., BERTINI, L., MAGRO, P., BUONOCORE, V. (1999) Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. **Plant Science** 140, 107-120.

CAVALCANTI, F.R. (2005). Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: Caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos. **Tese de Doutorado**. Departamento de Fitopatologia, UFLA, Lavras-MG.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., COSTA, J.C.B., SOUZA, R.M. (2006). Acibenzolar-S-Metil e Ecolife<sup>®</sup> na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira** 31(4), 372-380.

CHEN, Z., SILVA, H., KLESSIG D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science** 262, 1883-1886.

CIPOLLINI, D.F. (1998). The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical. **American Journal of Botany** 85 (11), 1586-1591.

COHEN, Y., NIDERMAN, T., MOSINGER, E., FLUHR, R. (1994). Gamma-aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology** 104, 59-66.

- CORDEIRO, M.C.R., SÁ, M.F.G. (1999). Biotecnologia e resistência a patógenos. Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br>. Acesso em: 16 de março de 2007.
- DAVIS, B. (1964). Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Annual Review of the New York Academy of Science** 121, 404.
- DESIKAN, R., REYNOLDS, A., ANCOCK, J.T., NEILL S.J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defense gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochemistry Journal** 330, 115-120.
- DOERGE, D.R., DIVI, R.L., CHUCHWELL, M.I. (1997). Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry** 250, 10-17.
- DONG, H., LI, W., ZHANG, D., TANG, W. (2003). Differential expression of induced resistance by an aqueous extract of killed *Penicillium chrysogenum* against *Verticillium* wilt of cotton. **Crop Protection** 22, 129–134
- DONG, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 1, 316-323.
- EL-SHORA, H.M. (2002). Properties of phenylalanine ammonia-lyase from marrow cotyledons. **Plant Science** 162, 1-7.
- FERNANDES, C.F. (1998). Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cv. Vita 3. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza.
- FRANCESCHI, V.R., KROKENE, P., CHRISTIANSEN, E., KREKLING, T. (2005). Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. **New Phytologist** 167, 353–376.
- FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUTRELLA, M., MEIER B., DINCHER, S., STAUB, T., UKNES, S., METRAUX J.P., KESSMANN, H., RYALS, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal** 10(1), 61-70.

FRITIG, B., HEITZ, T., LEGRAND, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology** 10, 16–22.

GARCÍA-LIMONES, C., HERVÁS, A., NAVAS-CORTÉS, J.A., JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., TENA, M. (2002) Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 61, 325-337.

GONDIM, D.M.F. (2006). Ação do acibenzolar-s-metil na reposta bioquímica de defesa do melão desafiado pelo *Fusarium pallidoroseum* e do meloeiro var. Orange Flesh. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza-CE.

GOODMAN, R.N., NOVACKY, A.J. (1994). The hypersensitive reaction in plants to pathogens: A resistance phenomenon. New York: **APS Press**, 256p.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell** 8, 629-643.

HAHN, M.G. (1996). Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology** 34, 387-412.

HAMMERSCHMIDT, R. (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology** 37, 285-36.

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent responses. **Plant Cell** 8, 1773–1791.

HAVIR, E.A., McHALE, N.A. (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** 84(2), 450-455.

HEIL, M., BOSTOCK, R.M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany** 89, 503-512.

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

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. (2002). Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. **Biochemical Society Transactions** 30(6), 930-935.

HUTCHESON, S.W. (1998). Current concepts of active defense in plant. **Annual Review of Phytopathology** 36, 59-90.

IRITI, M., FAORO, F. (2003). Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology** 151, 171-180.

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

KLESSIG, D.F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J.M., SHAH, J., ZHANG, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E., SILVA, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proceedings of the National Academy Science USA** 97, 8849-8855.

KOMBRINK, E., SCHMELZER, E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology** 107, 69-78.

KUC, J. (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology** 33, 275-297.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227, 680-685.

LALOI, C., APEL, K., DANON, A. (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology** 7, 323-328.

LAMB, C., DIXON, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology** 48, 251-275.

LANGE, B.M. LAPIERRE, C. SANDERMANN J.H. (1995). Elicitor-induced spruce stress lignin structural similarity to early developmental lignins. **Plant Physiology** 108, 1277-1287.

LATUNDE-DADA, A.O., LUCAS, J.A. (2001). The plant defence activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 58, 199-208.

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R.A., LAMB, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell** 79, 583-593.

LIU, H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology** 35, 263–269.

LOPEZ, A.M.Q., LUCAS, J.A. (2002). Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. **European Journal of Plant Pathology** 108, 409-420.

LUCAS, P.W., TURNER, I.M., DOMINY, N.J., YAMASHITA, N. (2000). Mechanical defences to herbivory. **Annals of Botany** 86, 913-920.

MALAMY, J., CARR, J.P., KLESSIG, D.F., RASKIN, I. (1990) Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. **Science** 250, 1002-1004.

MALOLEPSZA, U. (2006). Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylrutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. **Crop Protection** 25, 956 – 962.

MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A., MAESTRI, M. (2001). Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science** 160, 505-515.

MARTINS-MIRANDA, A.S. (2002). Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântula de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] exposta a salinidade e deficiência hídrica. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza.

MEE DO, H., CHUL LEE, S., JUNG, H.W., SOHN, K.H., HWANG, B.K. (2004). 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** 166, 1297-1305.

MÉTRAUX, J.P., SIGNER, H., RYALS, J., WARD, E., WYSS-BENZ, M., GAUDIN, J., RASCHDORF, K., SCHMID, E., BLUM, W., INVERARDI, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science** 250, 1004-1006.

MÍCKOVÁ, H., LUHOVÁ, L., LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., PEE, P. (2004). Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. **Plant Physiology and Biochemistry** 42, 753-761.

MORI, T., SAKURAI, M., SAKUTA, M. (2001). 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** 160, 355-360.

- NAKAZAWA, A., NOZUE, M., YASUDA, H. (2001). Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research** 114, 323-328.
- ORNSTEIN, L. (1964). Disk electrophoresis. I. Background and theory. **Annual Review of New York Academy of Science**, 121, 321.
- OWEN, K.J., GREEN, C.D., DEVERALL, B.J. (2002). A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology** 31, 47-53.
- PADIDAM, M. (2003). Chemically regulated gene expression in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 6, 169-177.
- QUINN, J., MYERS, R. (2002). Cowpea: A versatile legume for hot, dry conditions. **Jefferson institute in Columbia MO**, p.1-4.
- RAY, H., DOUCHES, D.S. HAMMERSCHMIDT, R. (1998). Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 53, 93-103.
- RAY, H., HAMMERSCHMIDT, R. (1998). Responses of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 53, 81-92.
- RODRIGUES, A.A.C., NETO, E.B., COELHO, R.S.B. (2006). Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: Eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira** 31(5), 492-499.
- RYALS, J.A., NEUENSCHWANDER, U.H., WILLITS, M.G., MOLINA, A., STEINER, H.Y., HUNT, M.O. (1996). Systemic acquired resistance. **Plant cell** 8, 1809–1819.
- SCANDALIOS, J.G.(1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: **A review. Biochemical Genetics**, 3, 33-39.
- SCHEEL, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. **Current Opinion Plant Biology** 1, 305–310.

- SCHOEMAKER, H.E., PIONTEK, K. (1996). On the interaction of lignin peroxidase with lignin. **Pure and Applied Chemical** 68(11), 2089-2096.
- SHIMONI, M. (1994). A method for activity staining of peroxidase and  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes in polyacrilamide eletrophoresis gels. **Analytical Biochemistry** 220, 36-38
- SIEGEL, B.Z. (1993). Plant peroxidase an organinismic perspective. **Plant Growth Regulation** 12, 303-312.
- SILVEIRA, J.A.G., COSTA, R.C.L., OLIVEIRA, J.T.A. (2001). Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brasilian Journal of Microbiology** 32, 187-194.
- SOARES, R.M., MARINGONI, A.C., LIMA, G.P.P. (2004). Ineficiência de Acibenzolar-S-Methyl na indução de resistência de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira** 29 (4), 373-377.
- SOBRINHO, C.A., VIANA, F.M.P., SANTOS, A.A. (2000). Doenças do feijão caupi. *In*: Embrapa Meio-Norte. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina.
- SOMSSICH, I., HAHLBROCK, K. (1998). Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. **Trends Plant Science** 3, 86-90.
- SOYLU, S., BAYSAL, O., SOYLU, E.M. (2003). Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science** 165, 1069-1075.
- SPARLA, F., ROTINO L., VALGIMIGLI, M.C., PUPILLO, P., TROST, P. (2004). Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*). **Scientia Horticulturae** 110, 269-279.

- STADNIK, M.J. BUCHENAUER, H. (2000). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 57, 25-34.
- STANGE, J.R.R., McDONALD, R.E. (1999). 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 Biotechnology** 15,185-193.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.P. (1997). Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology** 35, 235-270.
- SUTHERLAND, M.W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 39, 79-93.
- SYNGENTA (2007). Disponível em: [www.syngenta.com.br](http://www.syngenta.com.br) Acesso em 26/02/2007.
- TALARCZYK, A., HENNIG, J. (2001). Early Defence Responses. *In* Plants infected with pathogenic organisms. **Cellular and Molecular Biology Letters** 6, 955-970.
- URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. (1991). Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum** 13(1), 43-50.
- VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES, R., USALL, J., LARRIGAUDIÈRE, C. (2005). Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. **Postharvest Biology and Technology** 36, 227–234.
- van LOON, L.C. (1997). Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. **Europe Journal of Plant Pathology** 103, 753–765.
- van LOON, L.C., van STRIEN, E.A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-I type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 55, 85-97.

- van LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 44,135–62.
- VANCE, C.P., SHERWOOD, R.T. (1976). Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance. **Plant Physiology** 57, 915-919.
- VANCE, C.P., KIRK, T.K., SHERWOOD, R.T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology** 18, 259-288.
- VANDER, P., VARUM, K.M., DOMARD, A., GUEDDARI, N.E., MOERSCHBACHER, B.M. (1998). Comparison of ability of partially *N*-Acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology** 118, 1353-1359.
- WALTON, J.D. (1997). Biochemical plant pathology. In: Dey PM, Harborne JB, eds. **Plant Biochemistry**. San Diego, Ca, USA: Academic Press, 487–502.
- 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. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell** 3, 1085-1094.
- WENDEHENNE, D., DURNER, J., CHEN, Z., KLESSIG, A. (1997). Benzothiadiazole, and inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry** 47(4), 651-657.
- WOJTASZEK, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal** 322, 681-692.
- WU, C., SHORTT, B.J., LAWRENCE, E.B., LEÓN, J., FITZSIMMONS, K.C., LEVINE, E.B., RASKIN, I., SHAH, D.M. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants. **Plant Physiology** 11(5), 427-435
- ZHU, Y.J., QIU, X., MOORE, P.H., BORTH, W., HU, J., FERREIRA, S., ALBERT, H.H. (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 63, 237–248.

## **CAPÍTULO 3**

EFEITO DO BTH SOBRE O DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE PLANTAS  
DE FEIJÃO-DE-CORDA [*VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP.]

### 3.1 – INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] é uma das mais antigas culturas conhecidas pelo homem e sua origem está ligada ao continente africano. No Brasil, o feijão-de-corda foi introduzido no século XVI por colonizadores portugueses e escravos africanos (Ehlers e Hall, 1997). Dotado de alto conteúdo protéico, rico em minerais (cálcio, ferro) e vitaminas (van Le *et al.*, 2002; Wetzel *et al.*, 2005), atualmente, constitui cultura de subsistência para pequenos agricultores. Seu cultivo é realizado, predominantemente, em condições de agricultura de sequeiro. Esta leguminosa adapta-se relativamente bem a uma ampla faixa de climas e solos, possui boa capacidade de fixação de nitrogênio, sendo, ainda, pouco exigente em fertilidade e adaptada a altas temperaturas (20-35°C) (Araújo e Watt, 1988; Ehlers e Hall, 1997; Valenzuela e Smith, 2002).

Dentre os vários fatores que limitam a produção do feijão-de-corda no Brasil e nas várias regiões do mundo onde esta leguminosa é cultivada, as doenças causadas por herbívoros e microorganismos fitopatogênicos estão situadas entre as principais. Os danos causados por estes organismos afetam a quantidade de feijão produzido por hectare plantado, bem como, a qualidade dos grãos (Valenzuela e Smith, 2002).

Apesar da variedade de fatores bióticos e abióticos que ameaçam a sobrevivência e produtividade, não só do feijão-de-corda, mas das plantas como um todo, mecanismos pré-existentes, variando desde barreiras químicas a físicas, e mecanismos induzidos de defesa foram desenvolvidos ao longo da evolução, pelas plantas como estratégia de sobrevivência (Buchanan *et al.*, 2000). As defesas químicas incluem certas reações bioquímicas celulares que resultam em toxicidade contra estes organismos ou criam condições adversas ao seu desenvolvimento normal no interior da planta. Estas reações podem ser típicas do metabolismo do vegetal em condições naturais, como determinados processos metabólicos essenciais, ou podem ser ativadas, ou seja, induzidas, por determinados tipos de estresse que desequilibram a homeostase do vegetal (Heil e Bostock, 2002).

Uma característica interessante dessa defesa induzida é que ela pode se iniciar em uma única célula, tecido e/ou órgão específico do vegetal e se alastrar sistemicamente, preparando toda a planta contra a ameaça. Este mecanismo,

denominado de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR), tem papel central na resistência de plantas a patógenos (Friedrich *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Anfoka, 2000). A SAR é caracterizada pelo acúmulo coordenado de mRNAs codificados por um conjunto de genes de defesa, chamados “genes SAR” (Ward *et al.*, 1991). Neste conjunto de genes, pode ser dado destaque a muitos dos genes que codificam para PR-proteínas (proteínas relacionadas a patogêneses) (Sparla *et al.*, 2004; van Loon *et al.*, 2006).

O conjunto de proteínas de defesa denominado PR-proteínas encerra, por definição, proteínas que são induzidas, ou seja, proteínas que são sintetizadas *de novo* e/ou têm seus níveis acentuadamente aumentados em condições de doença ou situações de estresse relacionadas. Apesar de ser a mais aceita, esta definição ainda não é a ideal, pois várias proteínas são induzidas nas condições acima citadas, no entanto, não são classificadas como PRs (van Loon *et al.*, 2006).

Atualmente, cerca de dezessete famílias de PR-proteínas são descritas (van Loon *et al.*, 2006). Estas dezessete famílias compreendem, dentre outras, proteínas que atuam digerindo a parede celular de fungos e bactérias, por meio da hidrólise de seus constituintes estruturais. Como exemplo,  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases, hidrolases que degradam polímeros lineares de glucose unidos por ligação  $\beta$ -1,3, denominados  $\beta$ -1,3 glucanos e polímeros de *N*-acetil glucosamina, denominados de quitina, respectivamente, são citadas (Mee Do *et al.*, 2004). Enzimas do grupo das óxido-redutases envolvidas no processo de lignificação e, conseqüentemente, enrijecimento da parede celular, como as peroxidases, também são classificadas como PR-proteínas (Cipollini, 1998).

Além das PR-proteínas, outras enzimas participam do mecanismo de defesa de plantas ao ataque de patógenos como a fenilalanina amônia liase, enzima responsável pela conversão de fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico, intermediário chave no caminho para produção de lignina e ácido salicílico (SA) (Bowles, 1990), enzimas relacionadas ao balanço dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e outras (Cakmak e Horst, 1991; Buchanan *et al.*, 2000).

Todo o mecanismo de ativação da SAR e das reações subseqüentes decorrentes deste processo parece ser ativado nas plantas por meio de um elaborado sistema de troca de sinais entre moléculas provenientes do patógeno e

moléculas do vegetal. Essa comunicação molecular é denominada de “*cross talk*”, ou, “conversa cruzada”. Neste tipo de estudo uma das primeiras moléculas que parece estar envolvida na indução da SAR é o ácido salicílico (SA). Alguns trabalhos têm evidenciado que o SA é capaz de induzir este processo de defesa no vegetal (Malamy e Klessing 1992; Shah, 2003; Molinari e Loffredo, 2006).

Após a descoberta da participação do SA na indução de resistência em plantas, uma corrida incessante pela descoberta e desenvolvimento de novos ativadores químicos e, até mesmo, físicos, da SAR, foi iniciada. Tudo isso se deve, em parte, à grande necessidade que a agricultura moderna tem de utilizar recursos ambientalmente menos perigosos e mais baratos para o combate aos diversos problemas, especialmente os de natureza biótica, que ameaçam a produção vegetal mundial (Inbar *et al.*, 1998).

Nesse contexto, alguns análogos do SA têm sido industrialmente desenvolvidos e testados quanto aos seus potenciais em induzir SAR. Um exemplo é o caso do ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA), que tem sido relatado como substância ativadora da SAR (Metraux *et al.*, 1991). Outro análogo do SA bastante conhecido é o ácido (1,2,3)-benzotriazol-7-carboxílico S-metil éster (BTH), que tem sido apresentado como indutor de respostas de defesa em diferentes vegetais contra uma variedade de patógenos. Comercialmente, esta substância tem sido desenvolvida como parte integrante do produto comercial denominado BION<sup>®</sup>, desenvolvido pela empresa italiana Syngenta. O tratamento com BTH é, atualmente, considerado uma nova tecnologia no controle de doenças (Friedrich *et al.*, 1996).

Apesar dos resultados promissores, do ponto de vista de controle de patógenos, estes indutores de defesa sintéticos podem, dependendo das doses aplicadas, da cultura em questão e também da forma de aplicação, causar efeitos fitotóxicos às plantas. Estes danos podem afetar negativamente o desenvolvimento do vegetal e, finalmente, sua produção (Inbar *et al.*, 1998).

Estudos têm demonstrado que a resposta aos elicitores envolve, na maioria das vezes, síntese de compostos secundários e, portanto, a indução da resistência pode alterar a distribuição de carbono e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal. Segundo Hermann e Weaver (1999), a rota do chiquimato, responsável pela formação de grande parte destes compostos, é considerada uma das vias principais de fluxo de carbono nas plantas. Para inferir sobre a contribuição de diferentes

processos fisiológicos no desenvolvimento vegetal, a análise de crescimento é levada em consideração (Benincasa, 1988).

Infelizmente, pouco é descrito na literatura sobre os efeitos adversos de ativadores de defesa sintéticos. A falta de dados com respeito a este assunto torna o uso de indutores químicos algo ainda a ser estudado para determinadas culturas.

Diante do exposto este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do BTH sobre o desenvolvimento, produtividade e alguns parâmetros fisiológicos como, transpiração foliar e resistência estomática em plantas de feijão-de-corda, submetidas a dois tipos de aplicação, consistindo em borrifação foliar e embebição de sementes em soluções de BTH.

## 3.2 – MATERIAIS

### 3.2.1 – Material Vegetal

Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade do Estado do Piauí, EMBRAPA Meio-Norte.

### 3.2.2 – Reagentes Químicos

O ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH) foi utilizado a partir do produto comercial Bion<sup>®</sup> fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

### 3.3 – MÉTODOS

#### 3.3.1 - Experimento I - Efeito do Tratamento Foliar com BTH sobre o Desenvolvimento e Produção de Plantas de Feijão-de-corda

##### 3.3.1.1 - Condições de Plantio

Sementes de feijão-de-corda, genótipo TE 97-411-1E, com uniformidade de tamanho e cor e que não apresentavam sintomas de injúrias e do ataque de patógenos foram selecionadas e, então, semeadas em condições de campo (microparcelas). Ao solo foi incorporado húmus, 1,0 kg por metro linear, a uma profundidade média de 50 cm. As sementes foram semeadas em espaçamento de um metro entre linhas e 30 cm entre plantas. A irrigação das plantas foi realizada por um sistema tipo “xique-xique”, ou seja, tubos de filme plástico flexíveis com microfuros que distribuem a água uniformemente por toda a extensão de plantio (FIGURA 3.1 A).

O experimento foi realizado no período de novembro de 2005 a fevereiro de 2006 nas dependências da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici.

##### 3.3.1.2 – Tratamento das Plantas

No décimo dia após plantio (DAP) a parte aérea das plantas foi pulverizada com 500 µL de uma solução de BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM de ingrediente ativo (FIGURA 3.1 A). Plantas controles receberam apenas água destilada. As plantas foram diariamente observadas para identificação de sintomas de fitotoxicidade (FIGURA 3.1).



FIGURA 3.1 – Condições de plantio em campo de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. (A) Sistema de irrigação, (B) tratamento com pulverização da parte aérea, 10 dias após plantio (DAP); (C) e (D) plantas com 35 e 45 DAP, respectivamente.

### 3.3.1.3 – Avaliação da Interferência do Tratamento com BTH na Transpiração Foliar e Resistência Estomática

As medições da transpiração foliar e resistência estomática das plantas foram efetuadas utilizando porômetro (LICOR LI-1600), em estado de equilíbrio dinâmico, com medidas diretas de condutância estomática (FIGURA 3.2 A). Dez plantas por tratamento foram tomadas ao acaso por ocasião de cada medição. Em cada planta, uma folha sadia da parte superior, totalmente expandida e diretamente exposta à radiação solar foi selecionada para realização de tais medidas (Rodrigues, 1984). As medições foram realizadas aos 10 e 27 dias após tratamento (DAT), sendo escolhido o período do dia entre 10 e 12 h. Este intervalo de tempo foi escolhido por corresponder ao período onde o maior pico de radiação solar da região foi detectado. As análises foram realizadas em dias ensolarados, com céu claro e sem nuvens (FIGURA 3.2 B e C). Paralelamente às medidas da transpiração foliar e resistência estomática, parâmetros como temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar global foram monitorados com o uso do mesmo equipamento.

### 3.3.1.4 – Coleta e Avaliação do Efeito do Tratamento com BTH no Desenvolvimento e Produção de Sementes

Vinte dias após aplicação do BTH, dez plantas de cada tratamento, em triplicata, foram coletadas para avaliação do desenvolvimento da parte aérea. A avaliação foi realizada por meio da medição da massa da matéria fresca e comprimento do caule e massa da matéria fresca das folhas. A análise da interferência do BTH na produção do feijão-de-corda foi realizada utilizando vagens maduras provenientes de 100 plantas. Vagens maduras foram coletadas e avaliadas quanto a massa da matéria fresca, comprimento, número de sementes que continham e massa da matéria fresca das sementes. Avaliações quanto ao número de vagens por tratamento, número de vagens por planta e número e massa da matéria fresca total de sementes por tratamento também foram realizadas.

As medidas de comprimento foram feitas com auxílio de fita métrica e as massas foram de 0,001 g. determinadas em balança semi-analítica (Bioprecisa), com precisão

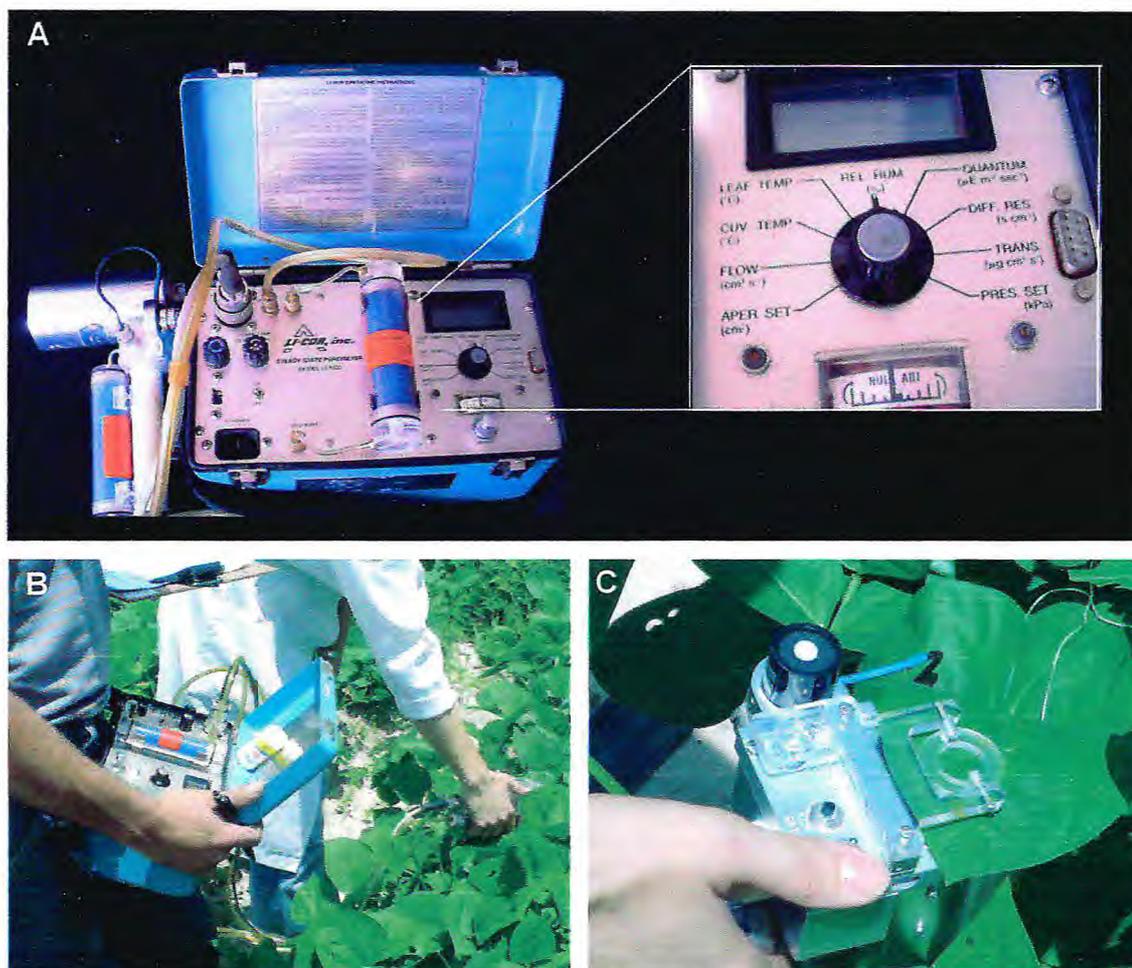


FIGURA 3.2 - Determinação da transpiração foliar e condutância estomática em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] 10 e 27 dias após tratamento com BTH. (A) detalhes do porômetro (LICOR LI-1600); (B) e (C) medidas realizadas com utilização de porômetro em plantas cultivadas em campo.

### 3.3.2 – Experimento II: Efeito do Tratamento de Sementes com BTH sobre o Desenvolvimento de Plantas de Feijão-de-corda

#### 3.3.2.1 – Tratamento das Sementes

Sementes de feijão-de-corda, genótipo TE 97-411-1E, foram previamente selecionadas de acordo com os critérios descritos no item 3.3.1.1. Sementes selecionadas tiveram sua superfície desinfetada com hipoclorito de sódio contendo 0,05% de cloro ativo por 3 minutos e, em seguida, foram lavadas em água destilada para completa remoção do hipoclorito de sódio.

O tratamento das sementes foi feito pela imersão das mesmas em soluções de BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM, na proporção de 10 mL de solução por semente. As sementes ficaram mergulhadas por período de 24 horas, sob aeração, em sistema consistindo de erlenmeyer e bombas de aeração (FIGURA 3.3). Plantas controles foram imersas em água grau Milli-Q.

#### 3.3.2.2 – Condições de Plantio

Sementes previamente tratadas foram semeadas em potes plásticos (1 litro), sendo utilizado como substrato areia retirada de leito de rio lavada exaustivamente em água corrente, seguida de água destilada, e autoclavada (121 °C,  $9,8 \times 10^4$  Pascal), por duas vezes, durante 30 minutos com intervalos de 24 horas a cada autoclavagem. Os potes foram mantidos em condições de casa de vegetação com temperatura média de 30 °C durante o dia e 25 °C durante a noite (FIGURA 3.4). As plantas foram regadas com água destilada até o sexto dia de plantio sendo, a partir daí, regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada por Silveira *et al.* (2001), aplicada em diluições decrescentes.



FIGURA 3.3 – Tratamento de sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] através de imersão, por 24 horas, em soluções aquosas de BTH (0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM). A relação utilizada foi de 10 mL de solução de BTH ou água grau Milli-Q (controle) por semente.

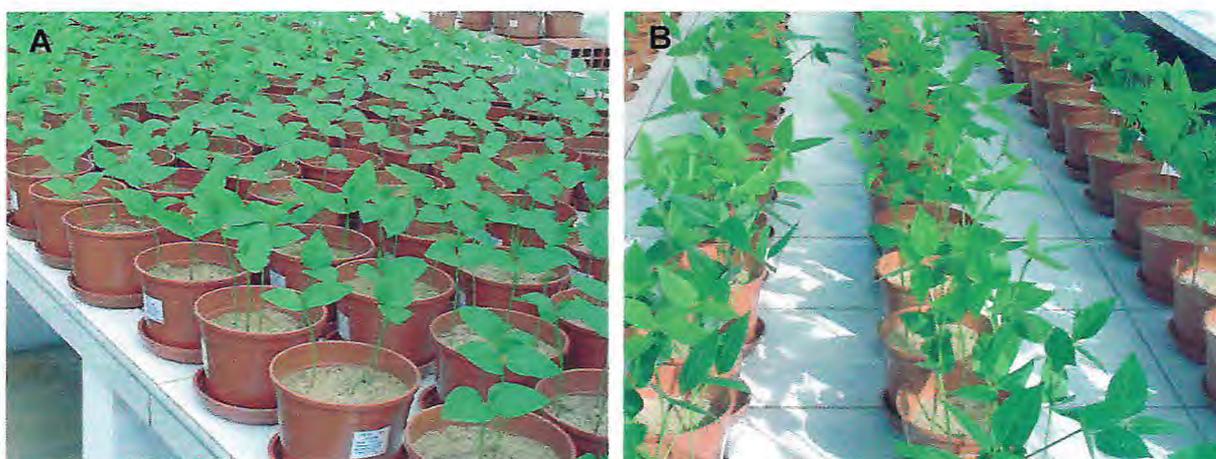


FIGURA 3.4 – Plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas com BTH, cultivadas em condições de casa de vegetação. (A) Plantas com 12 dias após plantio (DAP) e (B) plantas com 24 DAP.

### 3.3.2.3 – Coleta e Avaliação do Desenvolvimento das Plantas

As plantas foram coletadas nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 15 e 30 dias após plantio (DAP) e, após cada coleta, lavadas, enxugadas ligeiramente com papel de filtro e utilizadas para determinação da massa e comprimento dos seus órgãos. Medidas de comprimento foram realizadas com auxílio de fita métrica e as massas foram determinadas em balança analítica (Bioprecisa), com precisão de 0,0001 g, e balança semi-analítica (Bioprecisa), com precisão de 0,001 g.

A área de cada folha foi determinada da seguinte forma: inicialmente, um contorno de cada folha, cuja área seria medida, foi feito em papel milimetrado. Em seguida, esses desenhos foram recortados, pesados em balança analítica e, então, as massas obtidas para cada desenho foram relacionadas à massa de um cm<sup>2</sup> de papel milimetrado (unidade de referência).

### 3.3.3 – Análises Estatísticas

Delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento, sendo cada parcela representada por três plantas, foi empregado para as avaliações do tratamento das sementes. Dez plantas por tratamento foram selecionadas ao acaso para as avaliações de campo. O peso de 100 vagens e/ou sementes por tratamento, selecionados ao acaso, foram avaliados.

Teste *t* de Student, a 5% de significância, foi realizado com auxílio do Software SISVAR (Daniel Furtado Ferreira, 2003. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil).

### 3.4 – RESULTADOS

#### 3.4.1 – Efeito do Tratamento Foliar com BTH sobre o Desenvolvimento e Produção de Plantas de Feijão-de-corda

Plantas borrifadas com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM crescidas em condições de campo não apresentaram alterações nas taxas de transpiração foliar e resistência estomática nos dois dias de análises, 10 e 27 dias após tratamento (DAT) (FIGURA 3.5). Dez DAT as condições ambientais foram as seguintes: temperatura,  $32,3 \pm 0,8$  (°C); luminosidade,  $920,6 \pm 375,6$  ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) e umidade relativa do ar,  $75,3 \pm 3,8$  (%). Estas condições não foram diferentes das observadas aos 27 DAT: temperatura,  $32,4 \pm 1,1$ (°C); luminosidade,  $1180,7 \pm 477,2$  ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ) e umidade relativa do ar,  $67,7 \pm 3,3$  (%).

As avaliações de desenvolvimento das plantas realizadas aos 20 DAT mostraram alterações em decorrência da aplicação dos tratamentos. Os parâmetros massa fresca e comprimento do caule foram menores para plantas tratadas quando comparados com os das plantas controles, exceção das plantas tratadas com 0,3 mM (FIGURA 3.6 A e B). Os valores de massa foliar de plantas tratadas com 0,1; 1,0; 3,0 e 5,0 mM foram menores quando comparados aos das plantas controles (FIGURA 3.6 C).

Vagens e sementes foram avaliadas no final do ciclo reprodutivo das plantas. Apenas o tratamento de 0,3 mM de BTH causou aumento na massa da matéria fresca e no comprimento das vagens (FIGURA 3.7 A e B). Somente o tratamento de 5,0 mM de BTH causou diminuição no número de sementes por vagem (FIGURA 3,7 C). A massa da matéria fresca das sementes foi maior para os tratamentos de 0,3 e 1,0 mM (FIGURA 3,7 D).

O plantio em condições de campo foi realizado uma única vez e, em decorrência disto, as análises estatísticas para as avaliações do número de vagens por planta, número de vagens por tratamento, número de sementes e pesos de sementes por tratamento não foram apresentadas. Contudo, uma tendência de redução nestes parâmetros em decorrência dos tratamentos, à exceção do tratamento de 0,1 mM que parece causar aumento, é observada quando plantas tratadas foram comparadas às plantas controles (FIGURA 3.8).

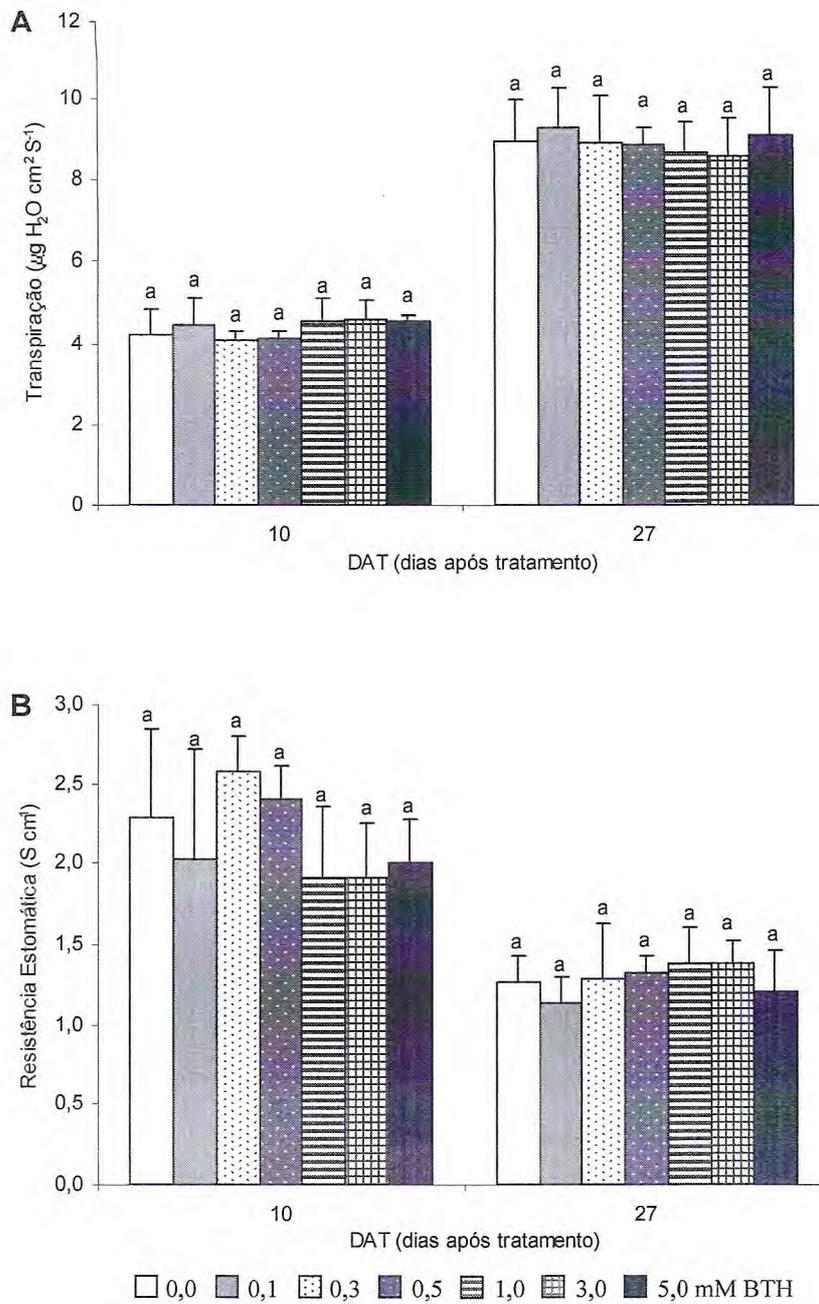


FIGURA 3.5 - Transpiração foliar (A) e resistência estomática (B) em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivadas em condições de campo e tratadas com BTH nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM. Avaliações feitas com utilização de porômetro 10 e 27 dias após tratamento (DAT). Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

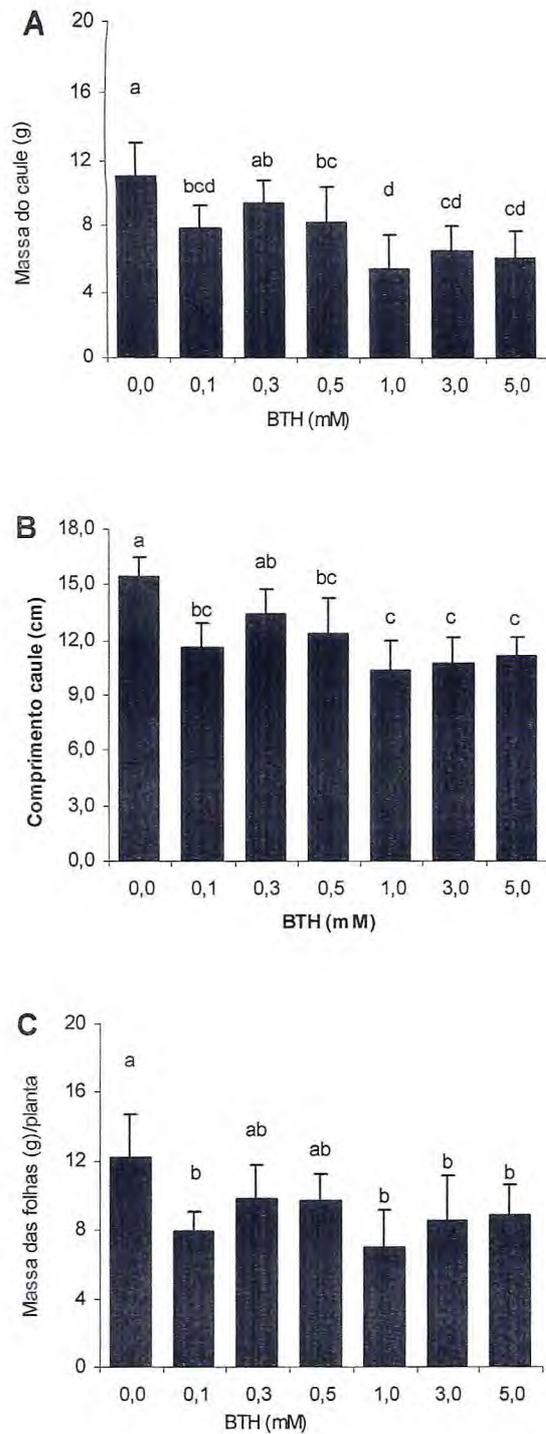


FIGURA 3.6 – Avaliação do desenvolvimento de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] tratadas com BTH nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM, aos 10 dias após plantio e cultivadas em condições de campo. Avaliações de (A) massa do caule, (B) comprimento do caule e (C) massa das folhas de uma planta, feitas 20 dias após tratamento. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

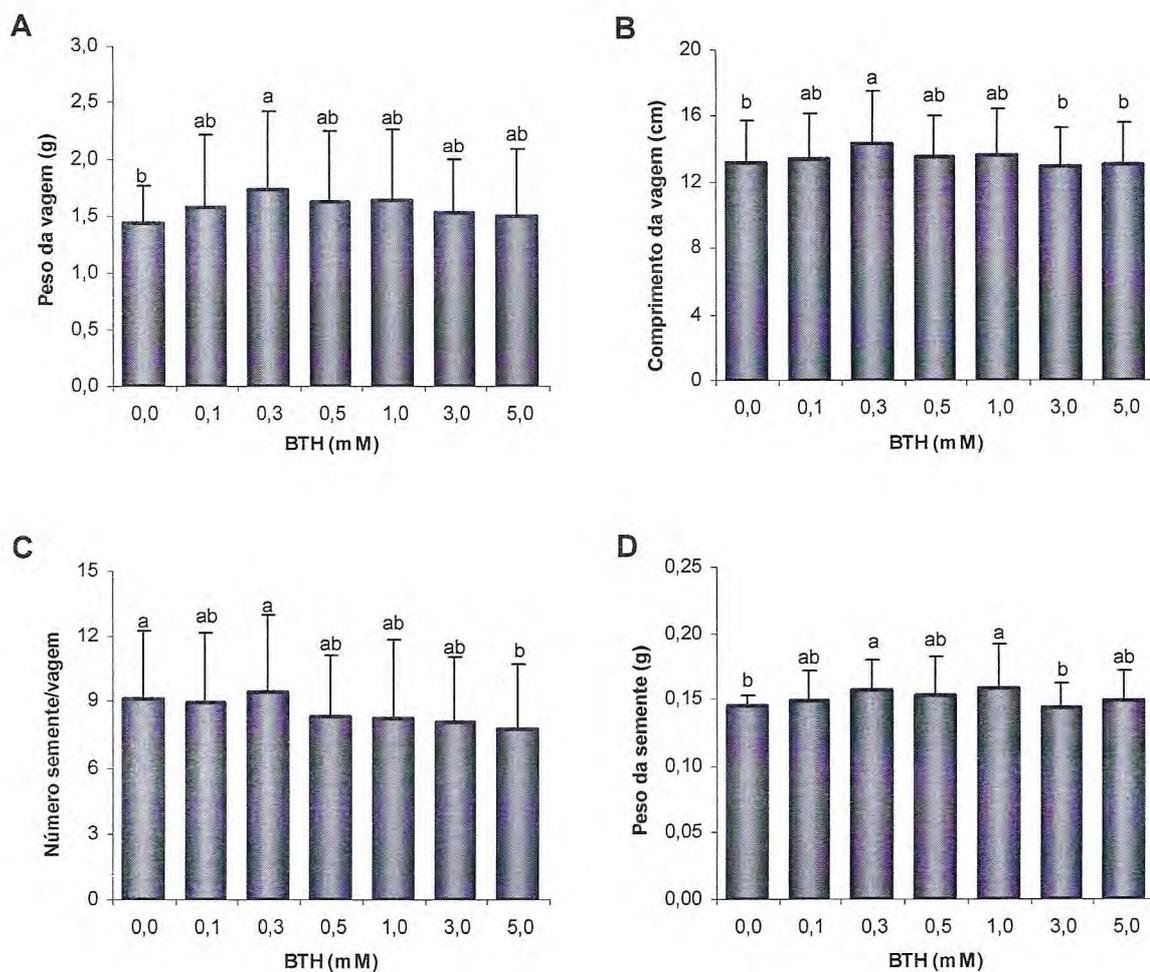


FIGURA 3.7 – Avaliação da produção de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivadas em condições de campo e tratadas com BTH nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM. (A) peso da vagem; (B) comprimento da vagem; (C) número de sementes por vagem e (D) massa da matéria fresca média da semente. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

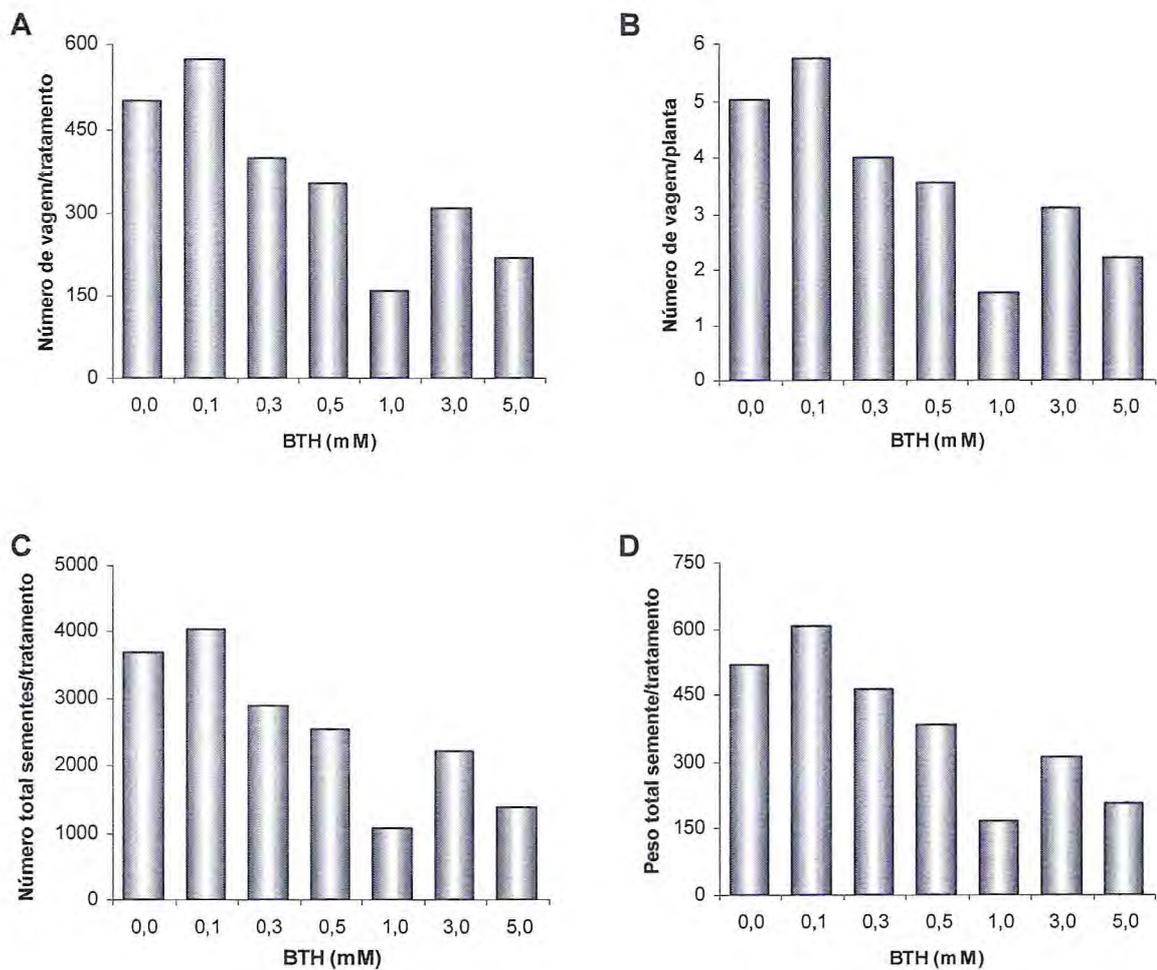


FIGURA 3.8 - Avaliação da produção de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cultivadas em condições de campo e tratadas com BTH nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; e 5,0 mM. (A) número de vagens por tratamento; (B) número de vagens por planta; (C) número total de sementes por tratamento e (D) peso total de sementes por tratamento.

### 3.4.2 – Efeito do Tratamento de Sementes com BTH sobre o Desenvolvimento de Plantas de Feijão-de-corda

Alterações no desenvolvimento de plantas provenientes de sementes tratadas com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 5,0 mM foram avaliadas.

Logo após o tratamento de sementes por imersão em soluções de BTH, durante 24 horas, estas foram pesadas e não apresentaram alterações quando comparadas com o controle (FIGURA 3.9 A). Nenhum efeito de toxicidade aparente foi verificado em sementes em decorrência dos tratamentos (FIGURA 3.9 B). Um dia após plantio, o desenvolvimento das plantas foi alterado, aparentemente, pela inibição da germinação em decorrência dos tratamentos de 3,0 e 5,0 mM (FIGURA 3.10). Cotilédones foram avaliados quanto à massa da matéria fresca, um, dois, três, quatro e cinco DAP (FIGURA 3.11). Alterações foram verificadas apenas nos cotilédones coletados com um DAP, sendo observada redução na massa dos cotilédones provenientes dos tratamentos com 3,0 e 5,0 mM de BTH (FIGURA 3.11 A).

Aparentemente, nenhum efeito de toxicidade foi visualizado em plantas provenientes de sementes tratadas com BTH, coletadas com três, quatro e cinco DAP (FIGURA 3.12). No entanto, as análises de massa e comprimentos de alguns órgãos vegetais demonstraram que, os tratamentos com BTH podem interferir no desenvolvimento de plantas de feijão-de-corda.

A massa do eixo embrionário, verificada dois DAP, foi reduzida em decorrência das aplicações do tratamento com 3,0 mM de BTH (FIGURA 3.13 A). Massas de plântulas provenientes de sementes tratadas com BTH nas concentrações de 0,3; 1,0 e 5,0 mM foram menores que as observadas para os outros tratamentos. O tratamento de 5,0 mM foi o que causou maior redução na massa (FIGURA 3.13 B). Os tratamentos de 2,0 e 5,0 mM de BTH causaram reduções nas massas de plântulas coletadas aos quatro DAP (FIGURA 3.13 C).

Os comprimentos das radículas foram menores para plântulas tratadas com 0,3; 3,0 e 5,0 mM de BTH coletadas aos dois DAP (FIGURA 3.14 A). Para as avaliações feitas em radículas de plântulas coletadas três DAP, os tratamentos com 3,0 e 5,0 mM de BTH causaram diminuição do comprimento da radícula (FIGURA 3.14 B). O tratamento com 5,0 mM de BTH causou redução no comprimento das radículas de plântulas coletadas com quatro DAP (FIGURA 3.14 C).

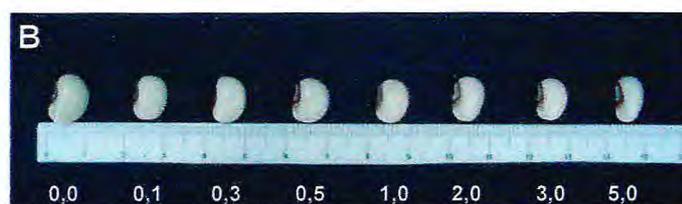
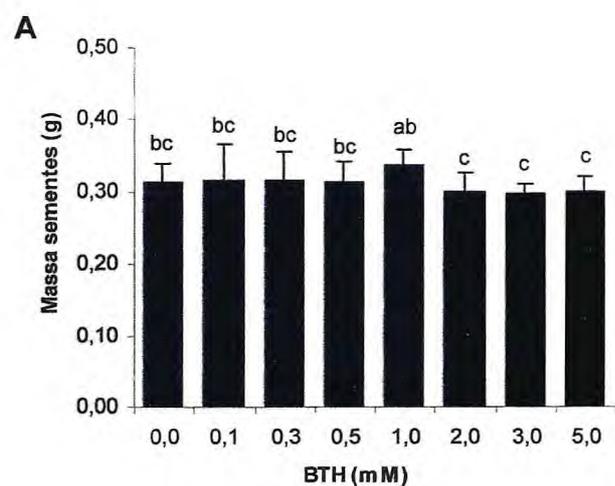


FIGURA 3.9 - Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] logo após tratamento por imersão em soluções de BTH nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM durante 24 horas. (A) Massa da matéria fresca de sementes; (B) sementes logo após terem sido retiradas das soluções de tratamento. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

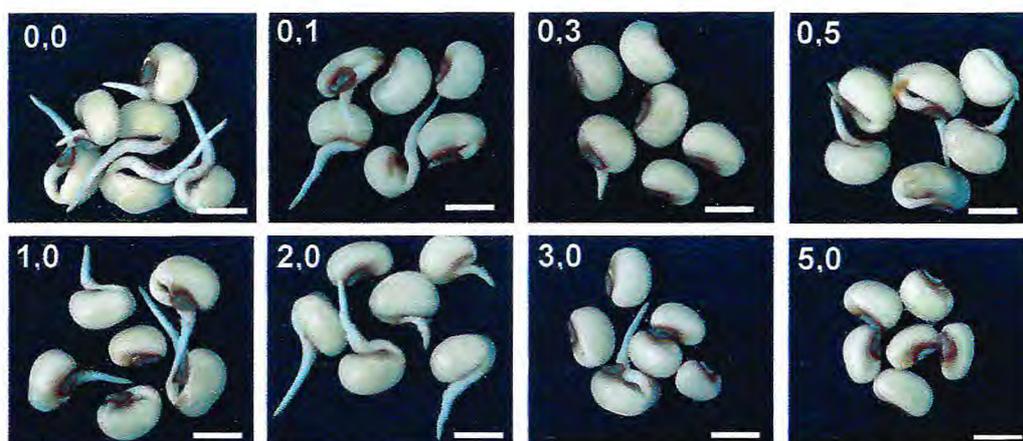


FIGURA 3.10 – Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. Um dia após plantio. Barra = um cm

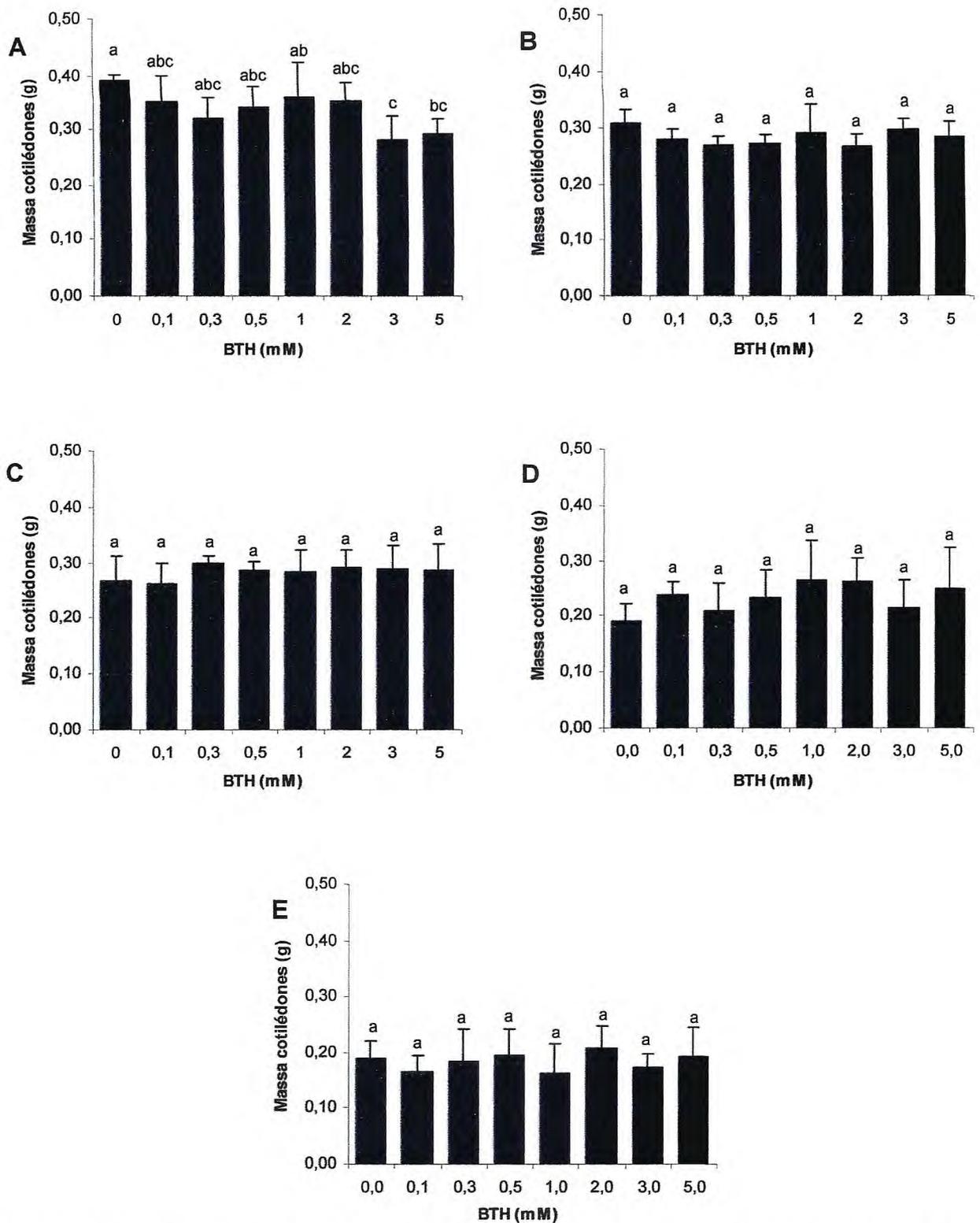


FIGURA 3.11 - Massa da matéria fresca de cotilédones de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. (A) Um; (B) Dois; (C) Três; (D) Quatro; (E) Cinco dias após plantio. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

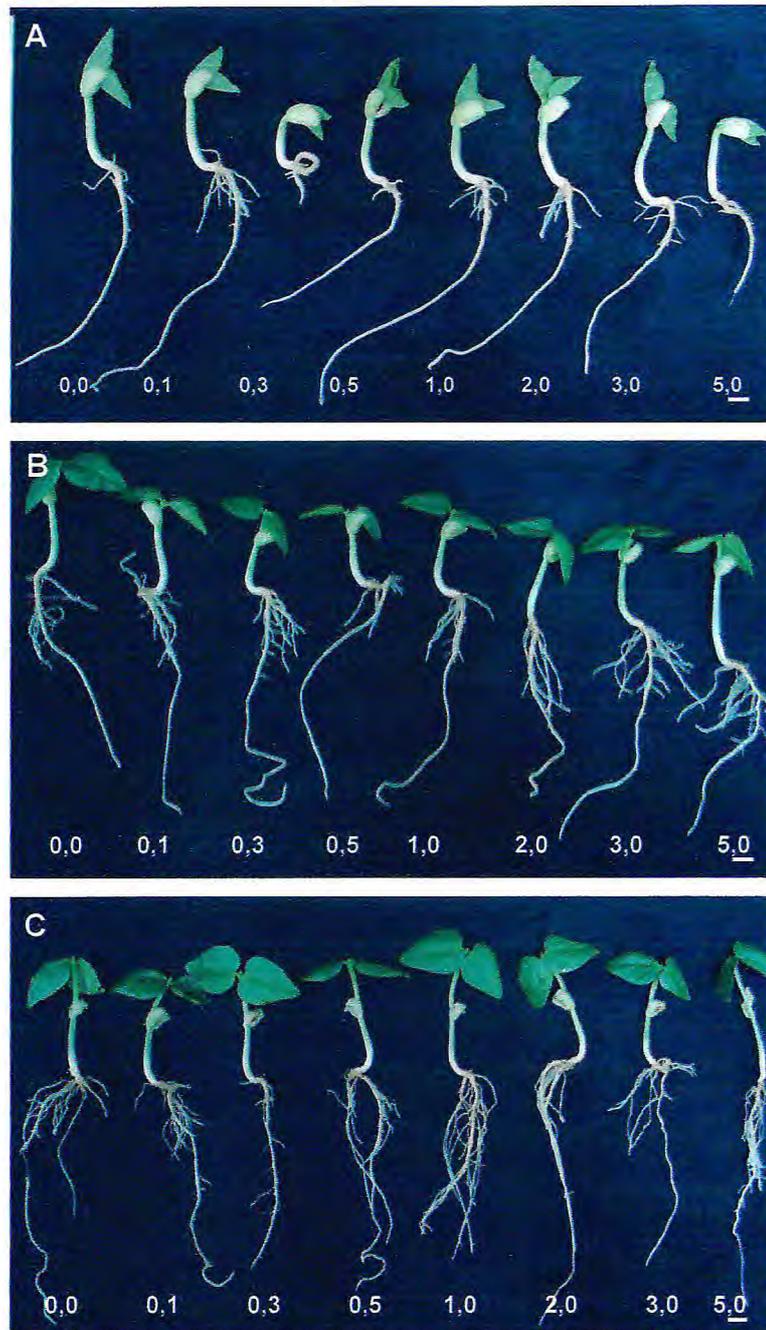


FIGURA 3.12 - Plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. Plantas com três (A), quatro (B) e cinco (C) DAP. Barra = um cm.

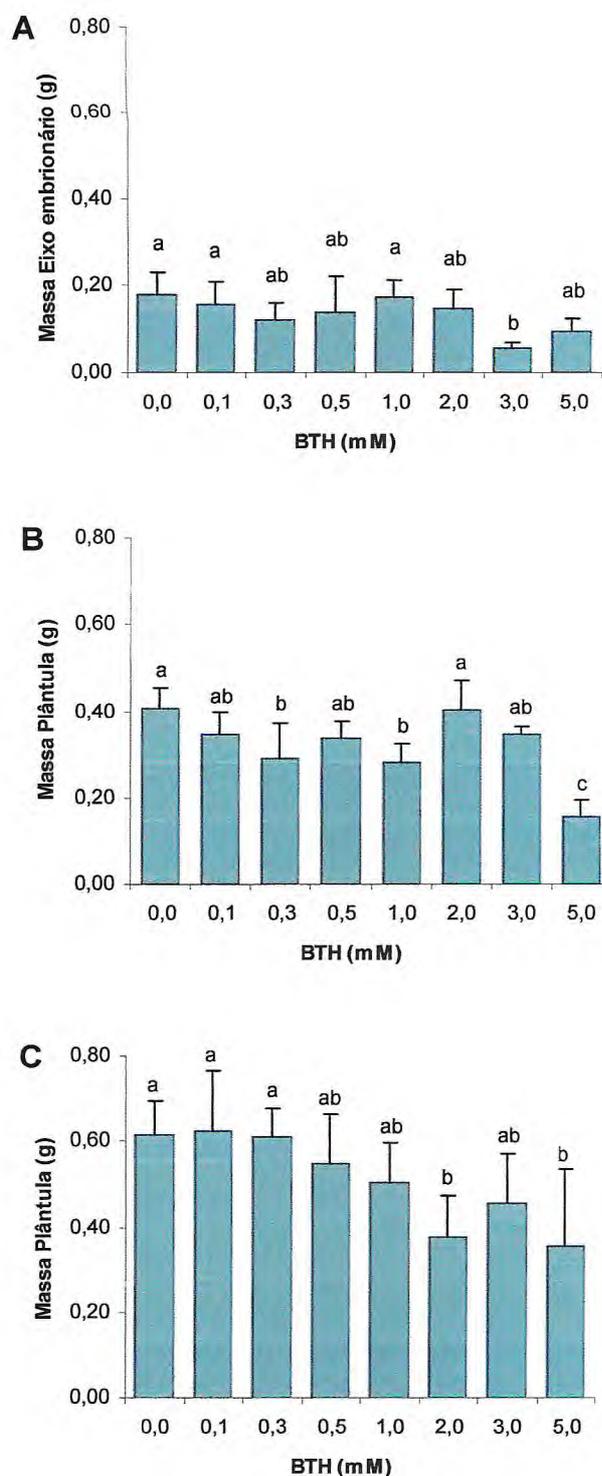


FIGURA 3.13 – (A) Massa de eixos embrionários coletados aos dois DAP e de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] coletadas aos (B) três e (C) quatro DAP, provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

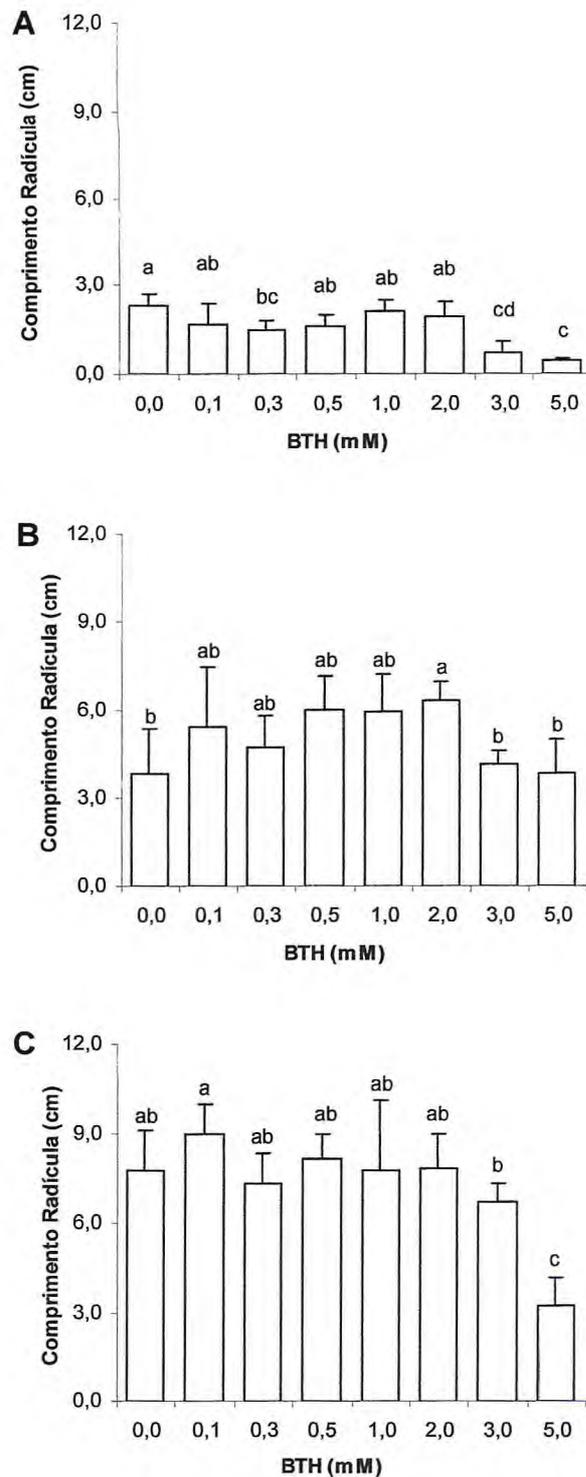


FIGURA 3.14 – Comprimento da radícula de plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. (A) Dois (B) três e (C) quatro DAP. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

Os parâmetros avaliados no caule, massa (cinco e quinze DAP) e comprimento (quinze DAP), não foram alterados em decorrência dos tratamentos com BTH (FIGURA 3.15).

Modificações nas massas das raízes de plantas com cinco e quinze DAP, em decorrência dos tratamentos com BTH, não foram observadas (FIGURA 3.16 A e B). No entanto, plantas tratadas com 0,1; 1,0 e 3,0 mM de BTH e coletadas com trinta DAP apresentaram redução na massa das raízes (FIGURA 3.16 C).

Avaliações de massa e área realizadas em folhas primárias de plantas, provenientes de sementes tratadas com BTH, coletadas aos cinco DAP não evidenciaram alterações (FIGURA 3.17 A e C). Entretanto, em plantas coletadas com quinze DAP, reduções na massa e área das folhas foram observadas em todos os tratamentos. (FIGURA 3.17 B e D).

Plantas oriundas de sementes tratadas com 5,0 mM de BTH, coletadas aos quinze DAP, apresentaram tamanho e área foliar menores que plantas controles (FIGURA 3.18)

Maior interferência dos tratamentos com BTH foi verificada em folhas secundárias coletadas com quinze DAP (FIGURA 3.18 A). A redução na massa e área das folhas secundárias parece ser do tipo dose dependente (FIGURA 3.19 A e B), onde plantas provenientes do tratamento com 3,0 e 5,0 mM de BTH apresentaram os menores valores. A avaliação da parte aérea com trinta DAP não apresentou diferenças entre plantas provenientes de sementes tratadas e controle (FIGURA 3.19 C).

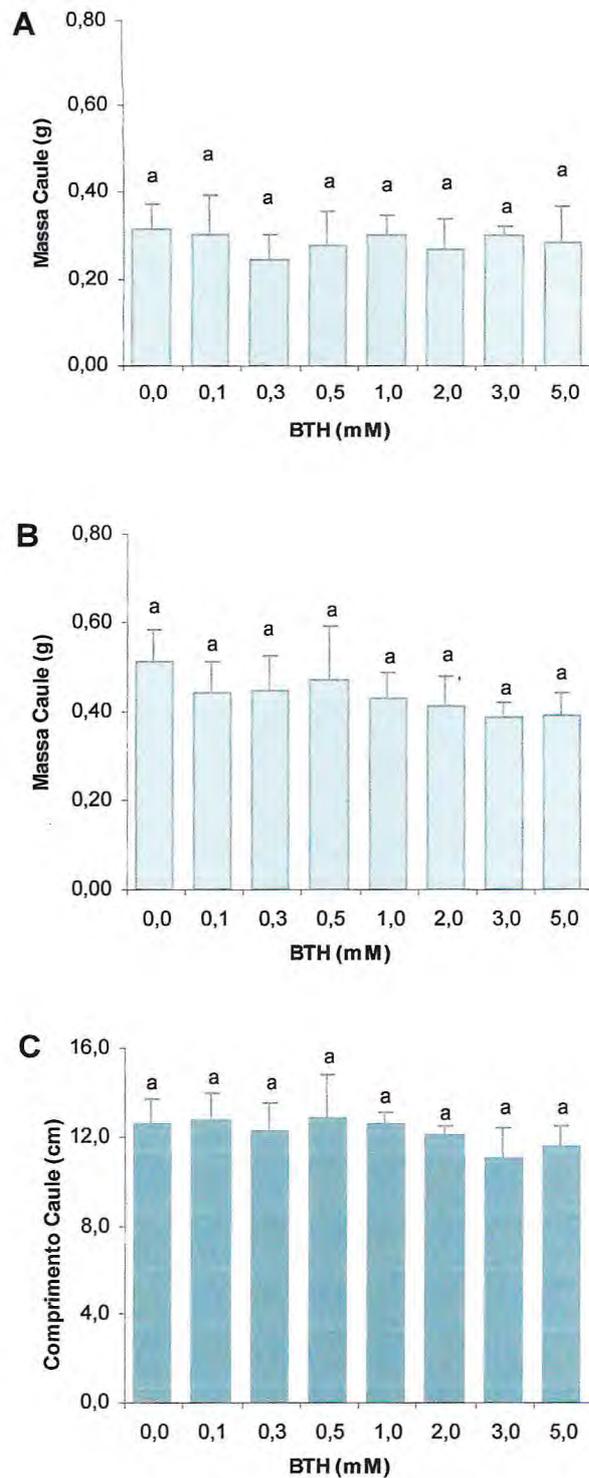


FIGURA 3.15 – Avaliação do desenvolvimento de caules de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. Massa do caule, (A) cinco, (B) quinze DAP e (C) comprimento do caule quinze DAP. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

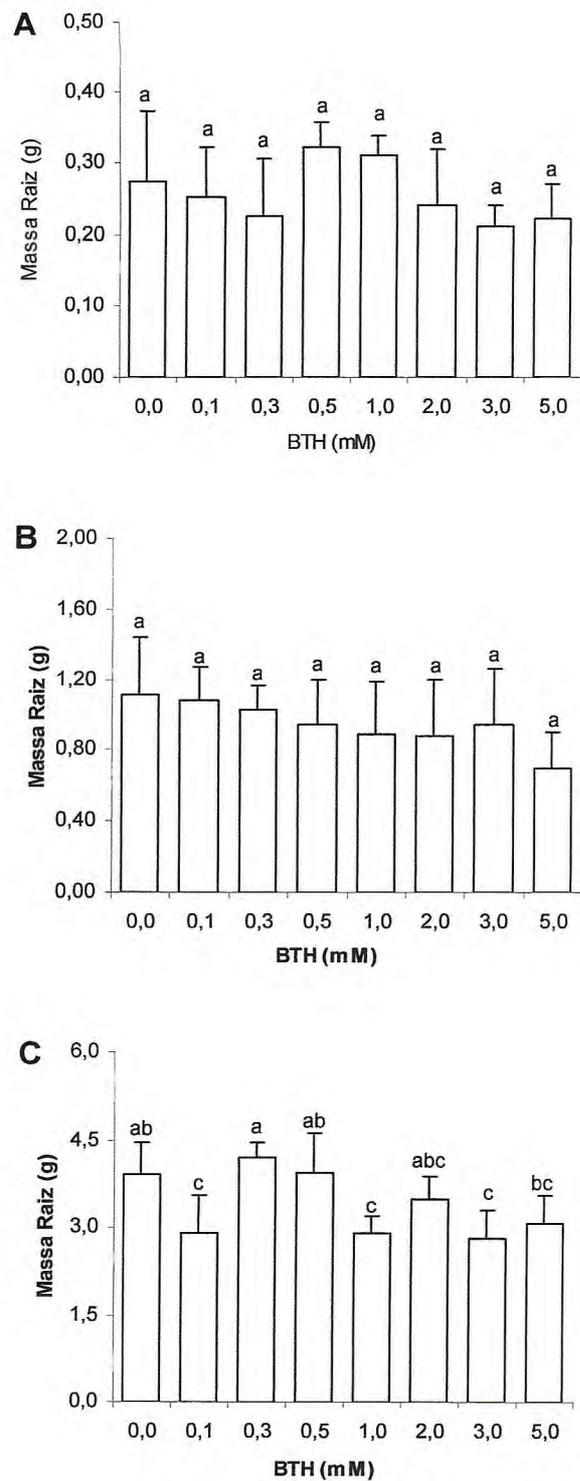


FIGURA 3.16 - Massa das raízes de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. (A) Cinco, (B) quinze e (C) 30 DAP. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

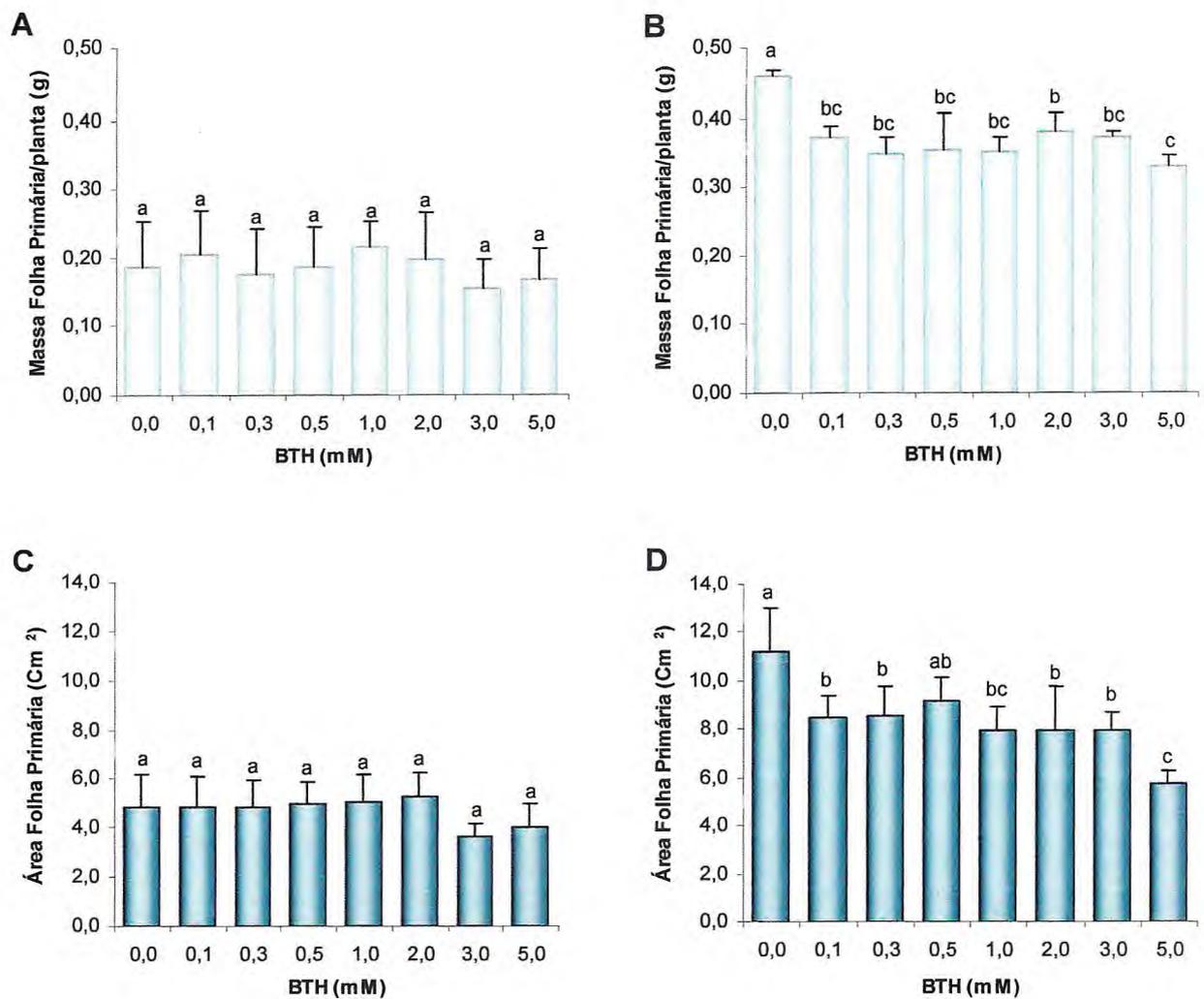


FIGURA 3.17 - Avaliação do desenvolvimento de folhas primárias de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. Massa das folhas de uma planta, (A) cinco, (B) quinze DAP e área de folha (C) cinco e (D) quinze DAP. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.



FIGURA 3.18 - Plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], com quinze DAP, provenientes do tratamento de sementes por imersão em soluções aquosas de BTH, durante 24 horas. (A) e (B) Parte aérea e (C) folhas. À esquerda plantas controles e a direita plantas provenientes do tratamento de sementes com 5,0 mM de BTH.

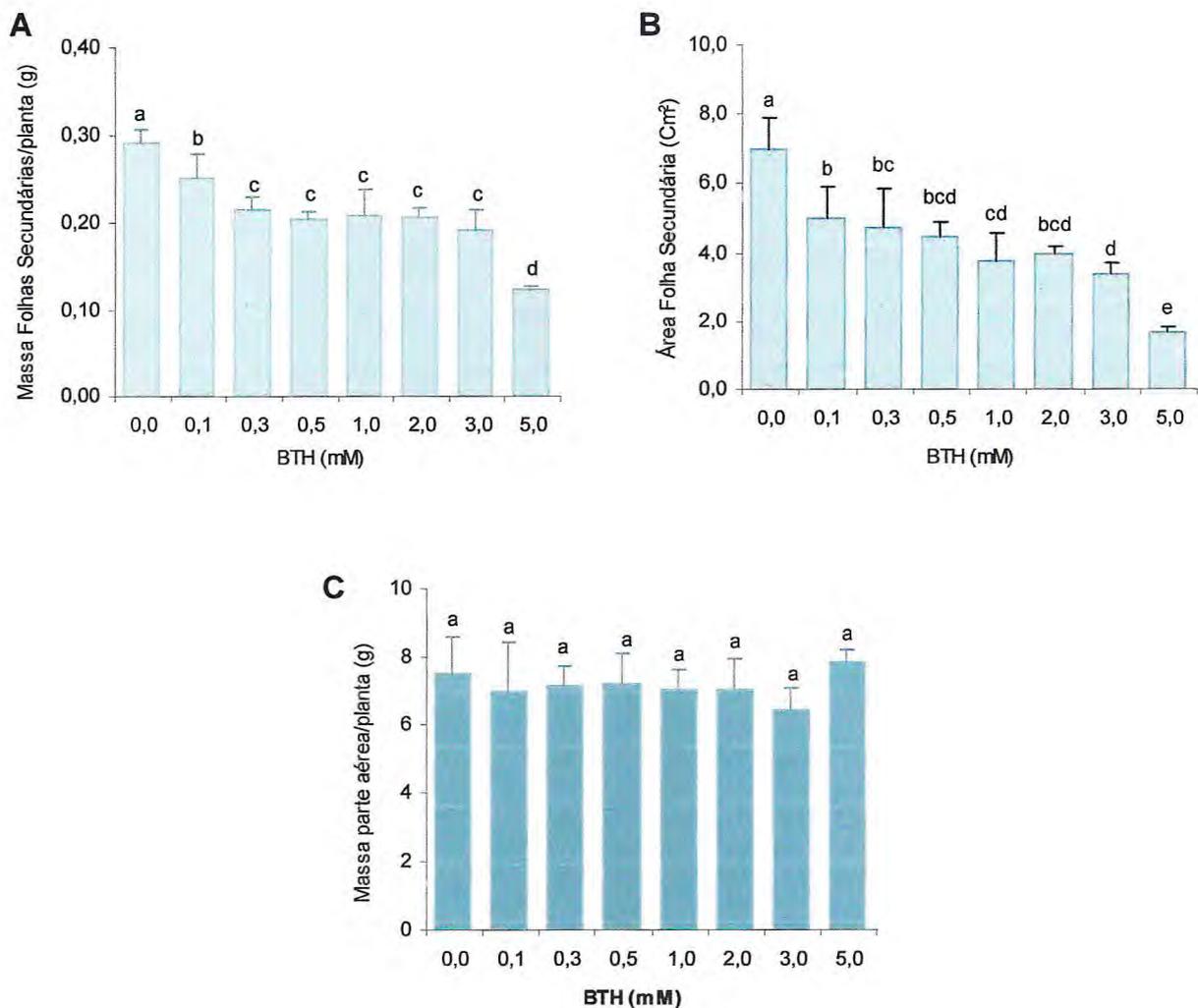


FIGURA 3.19 - Avaliação do desenvolvimento foliar de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], provenientes de sementes tratadas por imersão em soluções de BTH (0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 5,0 mM), durante 24 horas. (A) Massa e (B) área de folhas secundárias, quinze DAP e (C) massa da parte aérea de plantas, 30 DAP. Barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão entre as repetições. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos, de acordo com o teste-*t* de Student.

### 3.5 – DISCUSSÃO

Resultados sobre indução de resistência de plantas contra patógenos, em decorrência da ativação dos mecanismos de defesa vegetal por tratamento com elicitores, são constantemente relatados. Esta proteção conferida pela indução de resistência vem se tornando um potente método em substituição ao uso de agrotóxicos em culturas de grande importância econômica (Tripathi e Dubey, 2004). Contudo, existe uma constante preocupação com a fitotoxicidade que pode ser ocasionada por estes indutores. Objetivando investigar o uso do ácido (1,2,3)-benzotriazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH) na proteção da cultura de feijão-de-corda, este trabalho avaliou o desenvolvimento e produção de plantas tratadas com e plantas originadas de sementes pré-tratadas com este composto.

O tratamento realizado através da pulverização da parte aérea de plantas de feijão-de-corda com BTH nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM, demonstrou que o uso do BTH pode reduzir o crescimento da planta e, conseqüentemente, seus índices de produção, quando análises foram efetuadas aos 10 DAP. Porém, alterações morfológicas nas vagens e nas sementes não foram observadas, com exceção para o número de sementes por vagens que sofreu uma leve redução com o tratamento de 5,0 mM. Os experimentos aqui descritos mostraram uma tendência de redução na produção de vagens e sementes com a aplicação dos tratamentos. Contudo, a repetição dos experimentos, para análises mais conclusivas, se faz necessária. Os tratamentos com BTH não interferiram em parâmetros fisiológicos como transpiração foliar e resistência estomática de plantas cultivadas em campo.

Nas avaliações feitas em sementes tratadas com BTH, um leve atraso foi observado na germinação de sementes tratadas com 3,0 e 5,0 mM de BTH. Dados semelhantes de atraso na germinação de sementes e do crescimento de plantas foram observados quando sementes de melão foram tratadas de com metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico (SA) e BTH (Buzi *et al.*, 2004)

As avaliações realizadas em plantas provenientes de sementes tratadas demonstraram diminuição da maioria dos índices analisados, principalmente da parte aérea das plantas. Os efeitos do tratamento de sementes com BTH foram mais evidentes em folhas secundárias. Plantas avaliadas com 30 DAP não apresentaram diferenças quando analisado a parte aérea como um todo. Estes dados mostram que

as plantas tratadas podem se recuperar com o passar de seu desenvolvimento. Resultados semelhantes foram observados por Zhu *et al.* (2003) em plantas de mamoeiro, num experimento onde, o tratamento com 100 mM de BTH reduziu o tamanho das plantas e o diâmetro dos caules, em avaliações feitas 2 e 6 semanas após o tratamento. Dez semanas após o tratamento, estes efeitos não foram mais observados

A redução da área foliar pode ter ocorrido devido ao processo de lignificação da parede celular, o qual restringe o crescimento do tecido. O acúmulo de lignina constitui uma barreira mecânica à entrada de patógenos. No mecanismo de indução das respostas de defesa, esse acúmulo tem sido atribuído à ação de elicitores, capazes de induzir a atividade das enzimas que participam da síntese de lignina (Vander *et al.*, 1998; Cavalcanti, 2005).

Gondim (2006) observou que a massa fresca total de plantas de meloeiro tratadas com BTH nas concentrações de 0,3; 0,5 e 1,0 mM foi menor quando comparada com plantas controles. Grande redução na aérea foliar destas plantas, principalmente nas folhas secundárias, também foi verificada. Redução de 36 % na massa seca de plantas de *Cyclamen persicum* foi observada quando estas foram tratadas com BTH. Dados de fitotoxicidade têm sido apresentados em plantas de abacaxi (Chinnasri e Sipes, 2005) e tabaco (Cole, 1999). Efeitos, de fitotoxicidade incluindo o amarelecimento foliar, foram observados em *Cucumis sativus*, devido ao uso contínuo de BTH (Wurms *et al.*, 1999). Diferentemente, os tratamentos de plantas de cevada (Sonnemann *et al.*, 2005) e tomateiro (Cavalcanti *et al.*, 2006) com BTH não causaram alterações no crescimento.

### 3.6 – CONCLUSÃO

Nas condições experimentais adotadas neste trabalho, tanto a aplicação foliar como embebição de sementes de feijão-de-corda em BTH, a partir de concentrações superiores a 0,5 mM, causaram alterações negativas no desenvolvimento e produtividade de plantas de feijão-de-corda.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que, uma vez comprovada a efetividade do uso do BTH em plantas de feijão-de-corda contra patógenos, a aplicação do produto deve ser feita baseada em dados preliminares referentes ao efeito da concentração e forma de aplicação do BTH sobre o desenvolvimento e a produção da cultura.

### 3.7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANFOKA, G.H. (2000). Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl éster induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. **Crop Protection**, 19, 401-405.
- ARAÚJO, J.P.P. & WATT, E.E. (1988). O caupi no Brasil. IITA/EMBRAPA. Brasília-DF, p.722.
- BENINCASA, M.P.M. (1988). Análise de crescimento de plantas: noções básicas *In*: Antoniazzi, N. and Deschamps, C. **Growth analysis of two barley cultivars after elicitors and fungicides treatment**. **Ciencia Rural** 36 (4), 1065-1071.
- BOWLES, D.J. (1990). Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, 59, 873-907.
- BUCHANAN, M., GRUSSEM, W., JONES, R., (2000). Biochemistry e Molecular Biology of Plants. Editora American Society of Plant Physiologists. Rockville USA, 1367p.
- BUZI, A., CHILOSI, G., DE SILLO, D., MAGRO, P. (2004). 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. Phytopathology** 152, 34-42.
- CAKMAK, I., HORST, J.H. (1991) Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root Tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant. Copenhagen**, 83, 463-468.
- CAVALCANTI, F.R. (2005). Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauero por extratos naturais: Caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos. **Tese de Doutorado**. Departamento de Fitopatologia, UFLA, Lavras-MG.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., COSTA, J.C.B., SOUZA, R.M. (2006). Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na Indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira** 31(4), 372-380.

CHINNASRI, B. SIPES, B. (2005). Effect of a Systemic Acquired Resistance Inducer on Nematodes Infecting Pineapple *Acta Horticulturae* 666, 213-222.

CIPOLLINI, D.F. Jr. (1998). The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical. **American Journal of Botany**, 85 (11), 1586-1591.

COLE, D.L. (1999). The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. **Crop Protection** 18, 267-273.

EHLERS, J. D., HALL, A. E., (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Field Crops Research**, 53, 187-204

FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUTRELLA M., MEIER B., DINCHER S., STAUB T., UKNES S., METRAUX J. P., KESSMANN H., RYALS, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**. 10(1), 61-70.

GONDIM, D.M.F. (2006). Ação do acibenzolar-s-metil na resposta bioquímica de defesa do melão desafiado pelo *Fusarium pallidoroseum* e do meloeiro var. Orange Flesh. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza-CE.

HEIL, M., BOSTOCK, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany** 89, 503-512.

HERMANN, K.M.; WEAVER, L. M. The shikimate pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.473-503, 1999.

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

- INBAR, M., DOOSTDAR, H., SONODA, R.M., LEIBEE, G.L., MAYER, R.T. (1998). *Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. Journal Chem Ecol* 24, 135-149.
- MALAMY, J., KLESSING, D.F. (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal* 2, 643-654.
- MÉTRAUX, J.P., AHL GOY, P., STAUB, T., SPELCH, J., STEINEMANN, A., RYALS, J., WARD, E. (1991). Induced resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: Hennecke, H. and Verma, D.P.S. (Eds). **Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions** (1) 432-439.
- MEE DO, H., CHUL LEE, S., JUNG, H.W., SOHN, K.H., HWANG, B.K. (2004) 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**. 166, 1297-1305.
- MOLINARI, S., LOFFREDO, E. (2006). The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68, 69-78.
- RODRIGUES, T.J.D. (1984). Drought resistance mechanisms among peanut genotypes, **Dissertation** (PhD) - University of Florida, Gainesville.
- SHAH, J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 365-371.
- SILVEIRA, J.A.G., COSTA, R.C.L., OLIVEIRA, J.T.A. (2001). Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brasilian Journal of Microbiology** 32, 187-194.
- SONNEMANN, I., STREICHER, N.M. WOLTERS, V. (2005) Root associated organisms modify the effectiveness of chemically induced resistance in barley. **Soil Biology & Biochemistry** 37, 1837-1842

- SPARLA, F., ROTINO L., VALGIMIGLI, M.C., PUPILLO, P., TROST, P. (2004). *Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (Erwinia amylovora)*. **Scientia Horticulturae**. Article in press.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.-P. (1997) Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, 35, 235-270.
- TRIPATHI, P., DUBEY, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology** 32, 235-245.
- VALENZUELA, H., SMITH, J. (2002). Cowpea. In: **Sustainable Agriculture Green Manure Crops**. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agricultura & Human resouces, University of Hawai'i Mānoa. SA-GM 6, 1-3.
- VANDER, P., VARUM, K.M., DOMARD, A., GUEDDARI, N.E., MOERSCHBACHER, B.M. (1998). Comparison of hability of partially *N*-Acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology** 118, 1353-1359.
- 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 Plant Physiology**, 15, 1-4.
- van LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Review Phytopathology**. 44,135–62.
- 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., (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**. 3, 1085-1094.
- WETZEL, M.M., FREIRE, M.S., FAIAD, M.G., FREIRE, A.B. (2005). Recursos genéticos: Coleção ativa e de Base. In: Freire-Filho, F. R., Lima, J. A. A., Ribeiro, V. Q. Feijão-caupi – Avanços tecnológicos. Brasília-DF, **Embrapa Informação Tecnológica**.

WURMS, K. LABBÉ, C., BENHAMOU, N., BÉLANGER, R.R. (1999) Effects of *milsana* and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on Cucumber. **Phytopathology** 89 (9), 728-736.

ZHU, Y.J., QIU, X., MOORE, P.H., BORTH, W., HU, J., FERREIRA, S., ALBERT, H.H. (2003). Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 63, 237–248.

## **CAPÍTULO 4**

---

BTH COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO-DE-CORDA [*VIGNA  
UNGUICULATA* (L.) WALP.] CONTRA O NEMATÓIDE DAS GALHAS  
*MELOIDOGYNE INCOGNITA*, RAÇA 1

#### 4.1 – INTRODUÇÃO

Os nematóides são organismos que escapam à nossa percepção devido ao seu ínfimo tamanho e sua coloração quase transparente. São animais multicelulares, alongados e se movem como serpentes, habitam solos, rios, lagos, mares e podem ser encontrados desde regiões extremamente frias até regiões de deserto. O número de espécies de nematóides está calculado em torno de um milhão, muitos dos quais são de vida livre existindo, também, nematóides parasitas de plantas, insetos e de animais (Guerena, 2006).

Nematóides parasitas de plantas são chamados de fitonematóides. Parasitam plantas superiores atacando, principalmente, seus órgãos subterrâneos, como raízes, bulbos, tubérculos e rizomas e, também, os órgãos aéreos, como caules, folhas e sementes (Freitas *et al.*, 1999). Possuem uma estrutura especializada, chamada de estilete, que perfura as paredes das células vegetais e serve de conduto às secreções produzidas por suas glândulas esofagianas. Também é pelo estilete que o nematóide ingere o conteúdo citoplasmático das células dos vegetais (Williamson e Kumar, 2006).

Nematóides do gênero *Meloidogyne* são tidos como os mais importantes porque têm ampla distribuição geográfica, apresentam enorme gama de hospedeiros e causam grandes danos às culturas vegetais (Freitas *et al.*, 1999; Silva, 2005). Estes são conhecidos como nematóides das galhas em decorrência das alterações anatômicas que provocam nas raízes das plantas parasitadas (Williamson e Kumar, 2006).

Durante o ciclo de vida, os ovos são depositados na raiz onde o juvenil de segundo estágio (J2), que representa a fase infectiva, eclode. Os J2 possuem, aproximadamente, 0,4 mm de comprimento, são atraídos por exsudatos radiculares, penetram na raiz e migram intercelularmente no córtex até o sistema vascular da planta hospedeira. Em resposta aos sinais emitidos pelo nematóide, as células da planta, adjacentes à extremidade anterior do juvenil, aumentam de tamanho formando, assim, células gigantes que são multinucleadas, metabolicamente ativas e irão servir como única fonte de nutrientes para o desenvolvimento e reprodução desses endoparasitas, constituindo seu sítio de alimentação. Ainda durante esta fase do parasitismo, algumas células do córtex iniciam inúmeras mitoses, formando

tumores na raiz, comumente denominados de galhas (Bezawada *et al.*, 2003; Williamson e Kumar, 2006).

Após o estabelecimento do sítio de alimentação, os nematóides se tornam sedentários e iniciam seu desenvolvimento pós-infectivo. Passam por três ecdises e atingem a fase adulta. As fêmeas são globosas, parasitas obrigatórios e permanecem imóveis no tecido vegetal, os machos possuem formato vermiforme, recuperam a mobilidade e deixam à raiz.

A produção de ovos começa com três a seis semanas depois da infecção, dependendo da espécie, da planta hospedeira e das condições ambientais (Williamson e Kumar, 2006). Durante o período de ovoposição, as fêmeas iniciam a secreção de uma substância mucilaginosa, que é eliminada pelas glândulas retais, a qual envolverá e protegerá os ovos que serão ali depositados. Esta mucilagem, juntamente com os ovos que nela se encontram embebidos, é denominada de massa de ovos. Com a eclosão de novos juvenis, que vão infectar a mesma ou outra planta, o ciclo de vida é reiniciado (Freitas *et al.*, 1999; Grundler e Böckenhoff, 2002).

Os sintomas mais característicos da infecção por nematóides do gênero *Meloidogyne*, as galhas, aparecem nas raízes e nos tubérculos, sendo a doença denominada meloidoginose. Raízes infectadas têm tamanho reduzido, rachaduras, deformidades e engrossam no local de estabelecimento do nematóide, originando as galhas típicas, que são duas a três vezes mais grossas do que as partes não infectadas da raiz. Plantas infectadas apresentam deficiência nutricional que, por conseqüência, levam à redução no crescimento, aparecimento de folhas pequenas, seguido de amarelecimento e murcha nos períodos mais quentes do dia. Os frutos são pequenos e sua produção é reduzida ou mesmo interrompida. Muitos destes sintomas facilitam infecções secundárias por patógenos oportunistas, uma vez que o vegetal se encontra enfraquecido e, dependendo do grau de infecção, a morte da planta poderá vir a ocorrer (Grunder e Böckenhoff, 2002, Freitas *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 2002).

O feijão-de-corda, uma importante leguminosa na produção agrícola do Brasil, é acometido por doenças causadas por nematóides (Freire-Filho *et al.*, 2005). Mais de 30 diferentes espécies de fitonematóides foram relatadas em associação com o feijão-de-corda. Mesmo com esse grande número, poucas causam prejuízos significativos à produção, com exceção dos nematóides das galhas, do gênero

*Meloidogyne*, dos nematóides das lesões radiculares, do gênero *Pratylenchus*, e do nematóide reniforme, espécie *Rotylenchulus reniformis*. Dentro do gênero *Meloidogyne*, as espécies *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood são as mais importantes para o feijão-de-corda, devido a agressividade e ampla distribuição geográfica desses nematóides (Silva, 2005).

No controle do nematóide das galhas, a utilização de produtos químicos com propriedades nematicidas não tem sido recomendada para o feijão-de-corda. O uso de cultivares resistentes, rotação de cultura, plantas antagonistas, revolvimento e inundação do solo e uso de matéria orgânica, que reduz a população de nematóides e, ainda, provoca aumento da tolerância das plantas, são formas alternativas de controle do nematóide em feijão-de-corda e são realizadas com o propósito de reduzir os prejuízos causados na produção de grãos (Freitas *et al.*, 1999; Agrios, 2005; Silva, 2005; Dutra *et al.*, 2006).

No Brasil, vários trabalhos têm sido realizados visando à identificação de fontes de resistência a *M. incognita* em feijão-de-corda (Freire-Filho *et al.*, 2005). As cultivares Seridó, Pitiubá (CE 31) e Quarenta Dias foram identificadas como cultivares resistentes a *Meloidogyne* spp (Ponte, 1977; Andrade, 2003). Avaliando vários genótipos em casa de vegetação, Silva (2000) identificou as cultivares BR 1-Parnaíba, BR 14-Mulato, Barrigudo e Vita 7 como resistentes a *M. incognita*. Capistrano (2004) confirmou a resistência dos genótipos BR 14-Mulato e Pitiubá (CE 31) e, ainda, adicionou à lista dos resistentes à raça 3 os genótipos Vita 3, BR 3-Tracuatea e 125 (MNC 99-521G-3). Freire-Filho *et al.* (2005) descreveram vários estudos que apresentam 31 genótipos como fontes de resistência a *M. incognita*.

Nos estudos de melhoramento genético do feijão-de-corda vários genótipos se destacam em ensaios de produtividade, mas em condições de cultivo em solo infestado com nematóides são suscetíveis e sua produção é diminuída pelo ataque deste patógeno. Por exemplo, o genótipo TE 97 411-1E, cuja produção é de cerca de 1.387 Kg/ha (Freire-Filho *et al.*, 2005), apresenta alta suscetibilidade a *M. incognita*, raça 3 (Capistrano, 2004).

As plantas possuem mecanismos de defesa que conferem resistência a vários patógenos (Odjakova e Hadjiivanova, 2001). A resistência sistêmica adquirida (SAR) é um mecanismo de defesa induzido que tem papel central na resistência de plantas (Friedrich *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Anfoka, 2000).

A SAR é caracterizada pelo acúmulo de mRNAs que codificam para um conjunto de genes cujos produtos de expressão estão envolvidos direta ou indiretamente com a defesa vegetal (Ward *et al.*, 1991). A expressão desse conjunto de genes, onde se incluem muitos dos genes que codificam para PR-proteínas (proteínas relacionadas à patogênese), também serve como critério que pode distinguir SAR de outras respostas de resistência (Ward *et al.*, 1991; Görlach *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Sparla *et al.*, 2004).

Vários fatores, bióticos e abióticos, tais como microrganismos virulentos e avirulentos, rizobactérias, fungos promotores de crescimento e ativadores químicos podem desencadear a SAR. Este processo tem ação duradoura, se faz presente em células e tecidos distantes do sítio de tentativa de infecção do patógeno, sendo inespecífico, podendo atuar contra uma variedade de inimigos das plantas, incluindo insetos, nematóides, fungos, bactérias e vírus (Owen *et al.*, 2002).

Como há disponibilidade de ativadores químicos de resistência, quer sejam naturais ou artificiais, que oferecem alternativas práticas e menos agressivas à saúde humana e ao meio ambiente (Romeiro, 2002), eles têm sido testados em várias plantas. O primeiro indutor de resistência disponível comercialmente, o ácido (1,2,3)-benzotiazol-7-carbótióico S-metil éster (BTH) é um dos exemplos do considerável avanço entre a integração da SAR e o programa de controle de doenças de plantas (Anfoka, 2000). O BION<sup>®</sup> 500 WG, nome comercial do BTH, produzido pela empresa italiana Syngenta, é um ativador das defesas naturais das plantas, não agindo diretamente contra os patógenos (Ishii *et al.*, 1999; Elmer, 2006). Aplicado nas plantas, ativa os seus próprios mecanismos naturais de defesa e aumenta sua resistência às doenças. Devido ao seu modo de ação particular, o produto deve ser aplicado antes da entrada dos patógenos, de forma preventiva. O produto é rapidamente absorvido pelos tecidos foliares e se transloca de forma sistêmica tanto para as folhas quanto para as raízes, ativando, assim, a planta de forma generalizada (Syngenta, 2007).

Quando aplicado conforme as recomendações do fabricante, o produto pode ser utilizado sem risco de fitotoxicidade. Além disso, estudos realizados em animais de laboratório, com administração de BTH por via oral, mostraram que cerca de 90% do produto ingerido é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, prontamente metabolizado e excretado (Syngenta, 2007).

Assim como para outros patógenos, o uso de compostos capazes de potencializar as defesas naturais das plantas pode representar uma alternativa promissora no controle do *M. incognita*. Pesquisas com o uso de BTH em feijão-de-corda já mostraram dados promissores no controle de doenças fúngicas. Assim, Rodrigues *et al.* (2006) conseguiram, após tratamento foliar com BTH, reduzir a severidade da doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Latunde-Dada e Lucas (2001) mostraram que sementes de feijão-de-corda imersas em solução de BTH deram origem a plantas com maior resistência ao fungo *Colletotrichum destrutivum*.

Sabendo da importância econômica e alimentícia do feijão-de-corda, dos impactos negativos na produção desta cultura decorrentes da ação do *M. incognita*, bem como do potencial do BTH na indução de respostas de defesa de plantas a seus inimigos naturais, este trabalho teve como objetivo responder a pergunta: o BTH é capaz de conferir resistência ao feijão-de-corda em relação à infecção causada pelo nematóide *M. incognita*, raça 1?

## 4.2 - MATERIAIS

### 4.2.1 – Material Vegetal

Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo TE 97 411-1E, suscetível ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Capistrano, 2004), foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade do Estado do Piauí, EMBRAPA Meio Norte. O genótipo CE-31, altamente resistente (Andrade, 2003; Freire-Filho *et al.*, 2005), foi fornecido pelo Banco de Sementes da Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fitotecnia (FIGURA 4.1).

Sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Kada Gigante e de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) cultivar Santa Cruz 47, obtidas comercialmente, foram utilizadas para manutenção dos nematóides.

### 4.2.2 – Meloidogyne incognita

Nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*, raças 1 e 4, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Rui Gomes Carneiro do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR e mantidos em condições de casa de vegetação infectando raízes de plantas de tomate e quiabo.

### 4.2.3 – Reagentes Químicos

Ácido (1,2,3)-benzotiadiazol-7-carbotióico S-metil éster (BTH) foi utilizado a partir do produto comercial Bion<sup>®</sup>, fornecido pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.



FIGURA 4.1 – Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. À esquerda: genótipos TE 97 411- 1E, à direita: CE-31.

## 4.3 - MÉTODOS

### 4.3.1 – Manutenção das Culturas de Nematóides

As sementes de tomate e quiabo foram lavadas, em água destilada e, em seguida, colocadas para germinar em bandejas de isopor (sementeira) contendo areia de leito de rio, previamente lavada e autoclavada (121 °C,  $9,8 \times 10^4$  Pascal) por duas vezes, durante 30 minutos, com intervalos de 24 horas a cada autoclavagem.

Dez dias após semeio as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,5 litros contendo como substrato uma mistura de húmus e areia de rio, na proporção de 1:2 (m/m), respectivamente, e utilizadas como hospedeiras. O substrato foi previamente esterilizado nas mesmas condições descritas acima. Três dias após transferência, cada planta foi inoculada com 3 a 5 massas de ovos depositadas na base do caule em um orifício de 2 cm de profundidade feito no substrato. As raízes foram coletadas sessenta dias após inoculação e lavadas, cuidadosamente, em água corrente, para remoção das partículas de substrato aderidas (FIGURA 4.2). As massas de ovos foram coradas por imersão das raízes em solução de fucsina ácida 0,1%, durante 30 minutos (Byrd *et al.*, 1983). A coleta das massas foi realizada com auxílio de hastes metálicas, sob microscópio estereoscópico, sendo as massas colocadas em tubos de microcentrífuga (tipo eppendorf) contendo água destilada. Estas massas foram usadas, ou na inoculação de novas plantas, para manutenção da cultura, ou para obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio (J2).



FIGURA 4.2 – Raízes de quiabeiro (*Abelmoschus esculentus*) cultivar Santa Cruz 47, inoculadas com *Meloidogyne incognita*, apresentando galhas típicas que evidenciam o sucesso da infecção causada pelo nematóide.

#### 4.3.2 – Preparo do Inóculo

##### 4.3.2.1 – Obtenção de Ovos de *M. incognita*

Os ovos foram obtidos pela técnica de McClure *et al.* (1972), com modificações. Massas de ovos obtidas conforme descrito no item 4.3.1 foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, contendo solução de hipoclorito de sódio a 0,05% de cloro ativo e trituradas, com auxílio de um pistilo, durante 2 minutos para liberação dos ovos. Os tubos foram agitados por 3 minutos em agitador de microtubos (marca eppendorf). A suspensão de ovos resultante foi rapidamente vertida em peneira com malha de 20  $\mu$ M de abertura (Granutest, 600 mesh). Os ovos retidos foram lavados por 3 vezes em água destilada, para remoção do hipoclorito de sódio e, em seguida, retirados da peneira com jatos de água destilada. Após isso, a suspensão contendo os ovos foi submetida à centrifugação a 1000 x *g*, 25 °C, durante 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido em solução de sacarose a 45% e novamente centrifugado, agora a 1000 x *g*, 25 °C, por 1 minuto. O sobrenadante foi depositado na peneira de 600 mesh e lavado em água destilada. Os ovos foram retirados da peneira através de jatos de água destilada, estéril, concentrados por centrifugação a 1000 x *g*, 25 °C, 1 minuto, contados em câmara de McMaster e, finalmente, armazenados em placas de Petri sob lâmina de água (FIGURA 4.3 A) em câmara para desenvolvimento de organismos biológicos (BOD – biological organisms development) a temperatura de 27 °C.

##### 4.3.2.2 – Obtenção dos Juvenis de Segundo Estádio (J2) de *M. incognita*

As massas de ovos, obtidas conforme item 4.3.1, passaram por processo de assepsia superficial que consistiu na imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio contendo 0,05% de cloro ativo, durante 3 minutos, seguida de 3 lavagens com água destilada estéril para retirada do hipoclorito (Hussey e Barker, 1973). Após a assepsia, as massas de ovos foram colocadas em câmaras de eclosão, constituídas por malha de tecido fino e poroso (tipo escaline), colocada sobre borda da parte inferior de uma placa de Petri de 2 cm de diâmetro, preenchida com água

grau Milli-Q, estéril. As massas de ovos foram depositadas sob a malha de tecido e a câmara de eclosão foi acondicionada em recipiente fechado e forrada com papéis de filtro umedecidos, e mantida em BOD a 27 °C. Os J2 que eclodiram migraram através da malha sendo coletados na placa de Petri. Os J2 eclodidos nas primeiras 24 horas foram descartados e aqueles com tempo de eclosão variando entre 48 e 72 horas foram coletados a cada 12 horas, contados e armazenados em béquer contendo água grau Milli-Q, estéril, até perfazerem o número suficiente para o experimento (FIGURA 4.3 B).

#### 4.3.3 – Avaliação da Mobilidade e Mortalidade de Juvenis de Segundo Estádio (J2) de *M. incognita*, Raças 1 e 4

A metodologia descrita por Silva *et al.* (2002), com algumas modificações, foi empregada para estas análises. Os J2 de *M. incognita*, raças 1 e 4, obtidos conforme descrito no item 4.3.2.2, foram colocados em soluções de BTH previamente esterilizadas em filtros de 25 µm. Um volume de 100 µL das soluções de BTH, nas concentrações de 0,0; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM de ingrediente ativo, foram aplicados em poços de placa de microtitulação (tipo ELISA) juntamente com 25 J2 por poço. A placa foi vedada e incubada a 26 °C em câmara para desenvolvimento de organismos biológicos (BOD). Após 12, 24 e 48 horas, os poços foram observados em microscópio estereoscópico e os nematóides avaliados quanto à mobilidade e mortalidade. Os ensaios foram realizados em cinco repetições, sendo utilizada água grau Milli-Q, estéril, como controle.

Os nematóides foram considerados: i) *móveis* - Quando apresentavam movimento contínuo; ii) *imóveis* - Quando estavam parados, mas se movimentavam ao serem tocados com uma haste fina de metal e iii) *mortos* - Mesmo com o toque da haste os juvenis não apresentavam movimentos. Os valores foram transformados em percentagens de J2 imóveis e vivos (Coimbra e Campos, 2005).

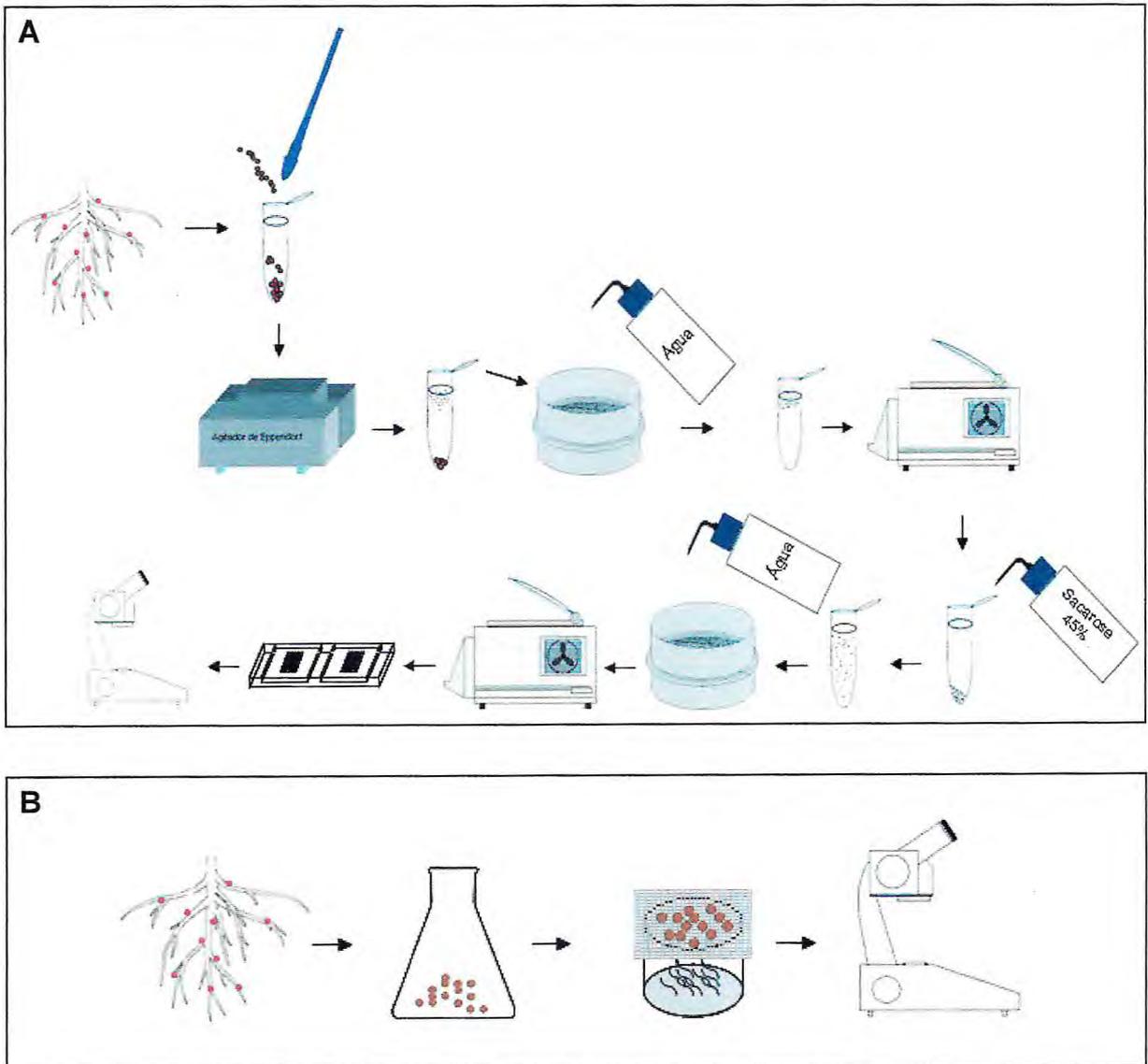


FIGURA 4.3 – Métodos para obtenção de ovos (A) e de juvenis de segundo estágio (J2) (B) de *Meloidogyne incognita*.

#### 4.3.4 – Uso do BTH como Indutor de Resistência em Feijão-de-corda Contra o Nematóide *M. incognita*

##### 4.3.4.1 – Condições de Plantio

As sementes de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E e CE 31, foram previamente selecionadas para germinação de acordo com o tamanho, conformação e cor. A superfície das sementes selecionadas foi desinfetada com hipoclorito de sódio contendo 0,05% de cloro ativo, por imersão, durante 3 minutos, lavadas abundantemente com água destilada estéril e, em seguida, imersas em água destilada, estéril, por 20 minutos, para pré-hidratação.

As sementes foram colocadas para germinar em vasos plásticos (1 litro), sendo areia retirada do leito de rios utilizada como substrato. Esta areia foi previamente lavada e esterilizada conforme item 4.3.1. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação, com luz natural solar, com temperatura média de 30 °C durante o dia e 25 °C durante a noite. As plantas foram regadas com água destilada, estéril, até o sexto dia de plantio sendo, a partir daí, regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada por Silveira *et al.* (2001), aplicada em diluições decrescentes.

##### 4.3.4.2 – Tratamento das Plantas

O BTH (BION<sup>®</sup>), da Syngenta, foi utilizado para indução de resistência. Seus grânulos, contendo 50% do ingrediente ativo acibenzolar-S-metil (CGA 245704), foram dissolvidos em água grau Milli-Q nas proporções de 0,3 e 0,5 mM de ingrediente ativo (i.a). O tratamento foi feito através da pulverização da parte aérea das plantas com 250 µL das diferentes concentrações de BTH, no décimo dia após plantio (DAP) (FIGURA 4.4). As plantas controles (TE 97 411-1E e CE 31 sem tratamento) receberam apenas água destilada, estéril (TE 0,0 e CE 0,0) (Sparla *et al.*, 2004).



FIGURA 4.4 – Tratamento, através de pulverização da parte aérea de plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], com 250  $\mu$ L das soluções aquosas de BTH nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM de i.a, no décimo dia após plantio (DAP).

#### 4.3.4.3 – Inoculação das Plantas

As plantas foram inoculadas 48 horas após aplicação dos tratamentos, correspondendo ao 12º dia após plantio. Uma suspensão de J2 e ovos, obtida conforme item 4.3.2, foi utilizada como inóculo. Um volume de 1,0 mL desta suspensão, contendo 250 ovos e/ou J2, foi depositado próximo à raiz de cada planta com o auxílio de uma pipeta, em orifício no substrato de 2 centímetros abaixo do nível do solo.

#### 4.3.4.4 – Coleta e Avaliação da Infecção

As coletas das plantas foram realizadas 30 dias após inoculação com o nematóide, para avaliação do grau de infecção através da contagem dos números de massas de ovos e de galhas, e com 60 dias após inoculação, para avaliação do efeito do tratamento com BTH no número de ovos por grama de tecido radicular.

As plantas coletadas com 30 dias após inoculação (DAI) tiveram suas raízes removidas, lavadas para retirada de substrato, pesadas, coradas com fucsina ácida a 0,1%, durante 30 minutos, e avaliadas em microscópio estereoscópico quanto aos números de galhas e de massas de ovos. A avaliação foi feita em todo o sistema radicular, devido ao fato de as galhas se distribuírem heterogeneamente, estando mais concentradas na região do tecido radicular que ficou em contato com a superfície do solo (local de inoculação) (McBride *et al.*, 1999).

Sessenta DAI, foi realizada uma segunda coleta de raízes para determinação do número de ovos por grama de tecido radicular. Cinco gramas do tecido radicular de cada planta foram seccionados em pedaços de 0,5 cm e estes depositados em erlenmeyer contendo 30 mL de hipoclorito de sódio (0,05 % de cloro ativo), na proporção de 1:6 (m/v), sendo agitados vigorosamente durante 5 minutos. A suspensão foi filtrada em peneira com malha de 53 µM de abertura (Granutest, 270 mesh), para retirada de fragmentos de raízes. A contagem dos ovos foi realizada em câmara de McMaster. A câmara de McMaster é constituída de duas células, sendo cada célula composta de uma área demarcada de 1 cm<sup>2</sup>. A altura da câmara, em cada célula, é de 0,15 cm (Matos e Matos, 1988). Portanto, o volume líquido sob cada área demarcada é de 0,15 mL. As duas células foram preenchidas com a

suspensão de ovos com o auxílio de uma pipeta e a câmara deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, a câmara foi levada ao microscópio óptico para realização da contagem de ovos. Foi utilizado aumento de 100 x. Uma regra de três simples, levando em consideração o volume da câmara e o volume da suspensão de ovos obtidos de 5 g de raiz, foi utilizada para determinação do número de ovos.

#### 4.3.5 – Análises Estatísticas

Cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado, foram empregadas para o experimento de avaliação da mobilidade e mortalidade de nematóides. Nos experimentos de avaliação da infecção por *M. incognita* do tecido radicular, foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, em triplicatas, sendo cada parcela representada por 10 plantas.

Teste *t* de Student, a 5% de significância, foi realizado com o auxílio do Software SISVAR (Daniel Furtado Ferreira, 2003. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil).

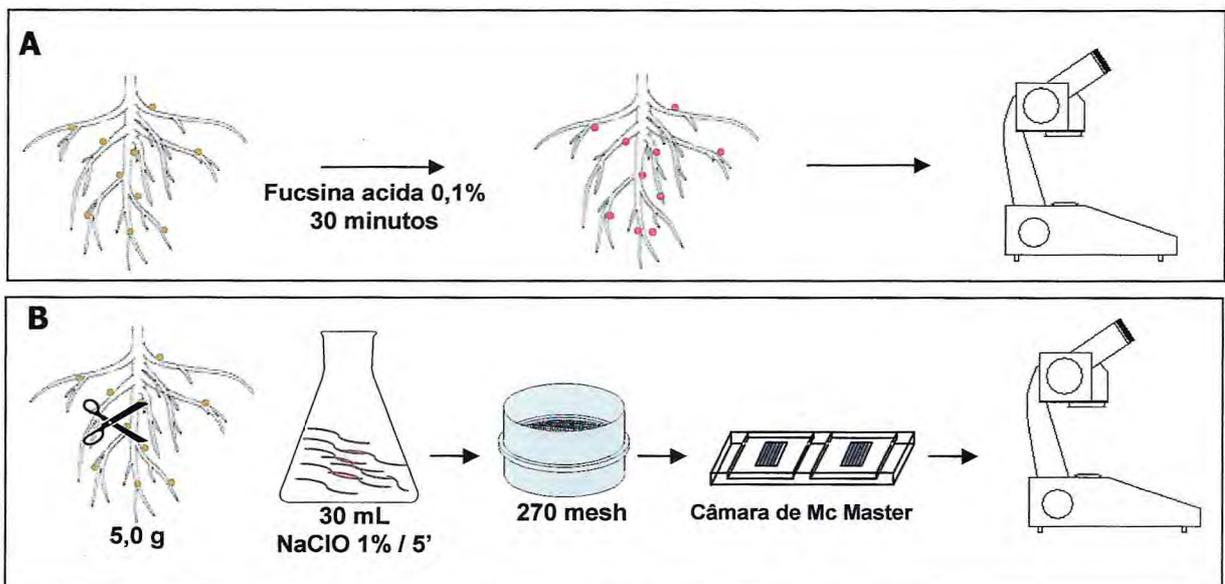


FIGURA 4.5 – Método aplicado para avaliação da infecção causada por *Meloidogyne incognita* em raízes de feijão-de-corda. (A) Contagem do número de galhas e massas de ovos em raízes com 30 DAI. (B) Avaliação do número de ovos em raízes coletadas com 60 DAI.

## 4.4 – RESULTADOS

### 4.4.1 – Efeito Direto do BTH sobre a Mobilidade e Mortalidade de Nematóides *M. incognita*, Raça 1 e Raça 4

O BTH, nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mM, não foi capaz de interferir na mobilidade dos J2 de *M. incognita*, raças 1 e 4, nas condições de experimento testadas e nos diferentes tempos de avaliação, ou seja, 12, 24 e 48 horas após incubação do nematóide com BTH (TABELA 4.1). Além disso, não foi observado nenhum efeito nematicida do BTH nos tempos avaliados (TABELA 4.2). Independentemente do tratamento ter sido com BTH ou água, houve, apenas, pequena redução tanto na mobilidade quanto na sobrevivência dos nematóides, mas em decorrência do tempo de permanência dos mesmos no meio experimental. Portanto, o BTH não teve ação deletéria sobre as raças 1 e 4 de *M. incognita*.

### 4.4.2 – Uso do BTH como Indutor de Resistência em Feijão-de-corda Contra o Nematóide *M. incognita*

Nas condições experimentais propostas, foi possível avaliar a capacidade do BTH, usado nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, em reduzir os índices de infecção do feijão-de-corda por *M. incognita*, raça 1. Estas concentrações testadas, não alteraram o desenvolvimento das plantas e não causaram fitotoxicidade aparente (FIGURA 4.6). Do mesmo modo, as raízes das plantas tratadas não apresentaram diferenças quanto ao desenvolvimento, em comparação com aquelas de plantas controle, medido através da massa da matéria fresca das mesmas, 30 dias após a inoculação. Entretanto, diferiram, visualmente, quanto à presença dos sintomas da infecção pelo *M. incognita* (FIGURA 4.7 e 4.8).

TABELA 4.1 – Efeito das diferentes concentrações de BTH na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, raças 1 e 4

BTH (mM)	(% de J2 móveis)					
	<i>M. incognita</i> , R1			<i>M. incognita</i> , R4		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
0,0	100* ± 0,0 <sup>a</sup>	99,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	96,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	93,8 ± 2,3 <sup>a</sup>
0,1	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	91,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	94,0 ± 1,7 <sup>a</sup>
0,3	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	90,6 ± 2,8 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	92,5 ± 1,3 <sup>a</sup>
0,5	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	99,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	89,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	99,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	95,9 ± 0,9 <sup>a</sup>
1,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	90,1 ± 5,3 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	94,7 ± 2,0 <sup>a</sup>
3,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	87,6 ± 4,8 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	91,3 ± 1,3 <sup>a</sup>
5,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	94,3 ± 8,1 <sup>a</sup>	86,0 ± 1,6 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	91,2 ± 0,3 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student.

TABELA 4.2 – Efeito das diferentes concentrações de BTH na mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, raças 1 e 4

BTH (mM)	(% de J2 vivos)					
	<i>M. incognita</i> , R1			<i>M. incognita</i> , R4		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
0,0	100* ± 0,0 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	96,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	99,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	94,2 ± 2,9 <sup>a</sup>
0,1	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	92,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	99,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	95,6 ± 2,1 <sup>a</sup>
0,3	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	91,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,6 ± 1,2 <sup>a</sup>	93,1 ± 0,5 <sup>a</sup>
0,5	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	99,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	93,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	96,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
1,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,5 ± 2,1 <sup>a</sup>	92,4 ± 2,1 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	95,4 ± 2,9 <sup>a</sup>
3,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	98,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	90,0 ± 6,1 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	96,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	91,8 ± 0,6 <sup>a</sup>
5,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,1 ± 4,0 <sup>a</sup>	89,3 ± 1,0 <sup>a</sup>	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	97,6 ± 1,7 <sup>a</sup>	94,1 ± 0,3 <sup>a</sup>

\* Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student.

O índice de infecção da planta pelo nematóide foi avaliado através da contagem do número de galhas presentes nas raízes. Nas plantas pulverizadas com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, 48 horas antes da inoculação com o nematóide, e avaliadas 30 dias após inoculação (DAI), o número de galhas foi menor, diferindo significativamente, do controle, embora não tenha havido diferença estatística entre estes números nas duas concentrações de BTH utilizadas (FIGURA 4.9). De fato, foi observado que o tratamento com BTH nas concentrações de 0,3 mM e 0,5 mM, causou redução de 11,1% e 19,7% no número de galhas, respectivamente, em relação às plantas controles.

Por outro lado, o número de massas de ovos presentes no sistema radicular do genótipo suscetível TE 97 411-1E, pré-tratado com 0,3 e 0,5 mM de BTH, não apresentou diferença significativa quando comparado com plantas controles (FIGURA 4.10).

Plantas coletadas com 60 dias após a inoculação foram avaliadas quanto ao número de ovos por grama de tecido radicular. Apesar dos valores demonstrarem redução para os dois tratamentos com BTH, apenas aquele feito com 0,5 mM de BTH foi capaz de reduzir, significativamente, o número de ovos, quando comparado com plantas controles. O percentual de redução do número de ovos para plantas tratadas foi de 8,5 e 34,2% para as concentrações de 0,3 e 0,5 mM de BTH, respectivamente (FIGURA 4.11).

Nas diferentes análises de infecção do *M. incognita* (número de galhas, número de massas de ovos e número de ovos), os valores obtidos para o genótipo CE-31 foram sempre e consistentemente inferiores aos obtidos para o genótipo TE 97 411-1E nos diferentes tratamentos, confirmando sua resistência a esse patógeno.



FIGURA 4.6 – Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com o nematóide *Meloidogyne incognita*, raça 1. Plantas controles (0,0 mM de BTH) foram pulverizadas com água e pós-inoculadas com o nematóide à semelhança das plantas testes. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado.



FIGURA 4.7 – Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre os sintomas de infecção em raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após pós-inoculação com o nematóide *Meloidogyne incognita*, raça 1. Plantas controles (0,0 mM BTH) foram tratadas com água e pós-inoculadas com o nematóide à semelhança das plantas testes. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado.

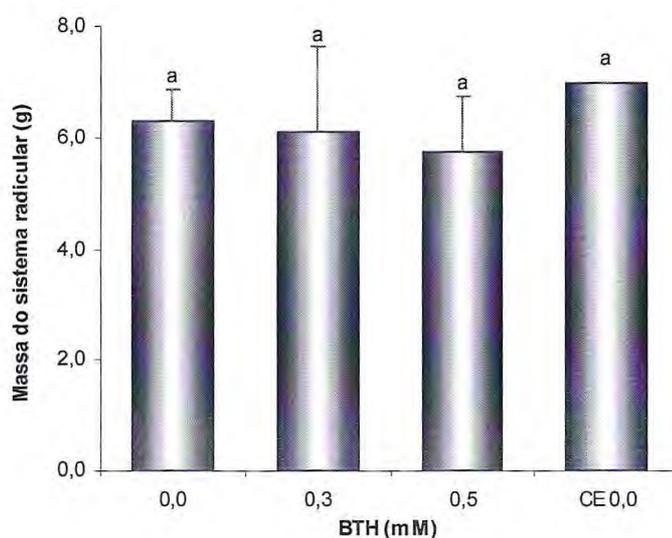


FIGURA 4.8 – Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre a massa da matéria fresca do sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Plantas controles (0,0 mM BTH) foram tratadas com água e pós-inoculadas com o nematóide à semelhança das plantas testes. As barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão das médias obtidas. Letras iguais denotam que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE0,0), é, também, apresentado.

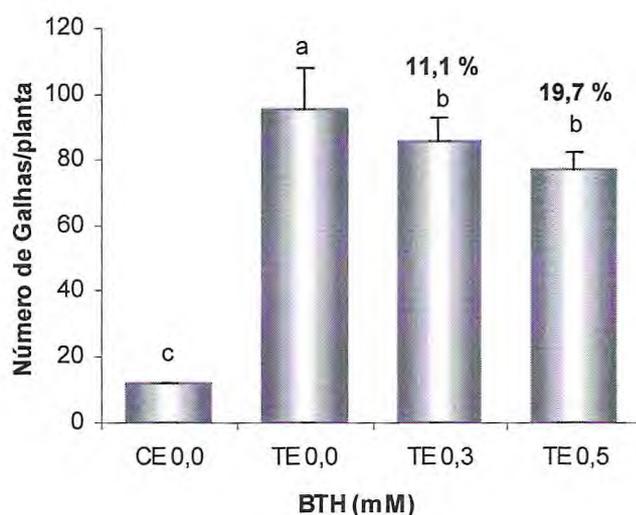


FIGURA 4.9 – Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre número de galhas presentes no sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Plantas controles (0,0 mM BTH) foram tratadas com água e pós-inoculadas com o nematóide à semelhança das plantas testes. As barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão das médias obtidas. Letras distintas sobre as barras denotam que houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado. Os valores acima das barras representam a redução (%) do número de galhas em relação ao controle (TE 0,0).

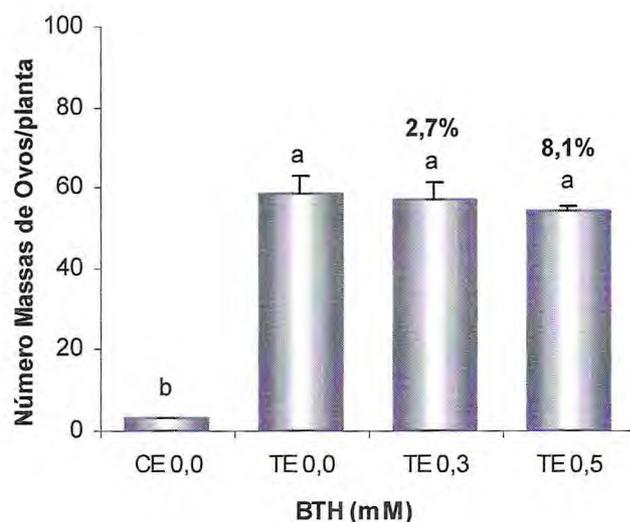


FIGURA 4.10 – Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre número de massas de ovos presentes no sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 30 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Plantas controles (0,0 mM BTH) foram tratadas com água e pós-inoculadas com o nematóide à semelhança das plantas testes. As barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão das médias obtidas. Letras distintas sobre as barras denotam que houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado. Os valores acima das barras representam a redução (%) do número de massas de ovos em relação ao controle (TE 0,0).

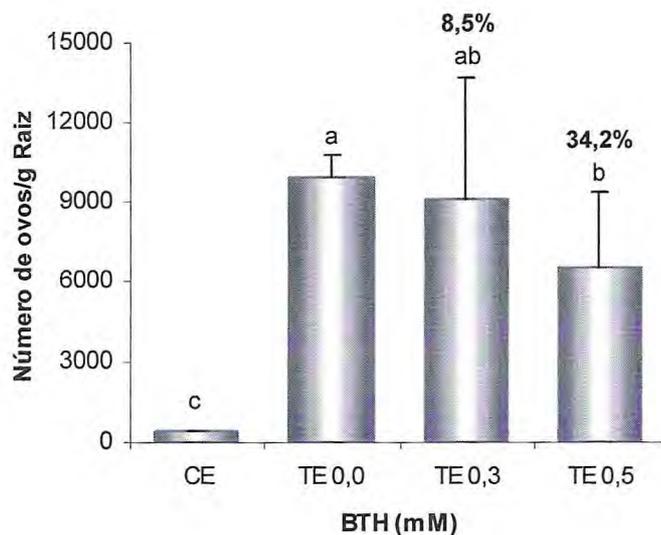


FIGURA 4.11 – Efeito do tratamento foliar com BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, sobre número de ovos presentes no sistema radicular de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411-1E (suscetível), 60 dias após inoculação com *Meloidogyne incognita*, raça 1. Plantas controles (0,0 mM BTH) foram tratadas com água e pós-inoculadas com o nematóide à semelhança das plantas testes. As barras verticais sobre as colunas representam o desvio padrão das médias obtidas. Letras distintas sobre as barras denotam que houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) de acordo com o teste-*t* de Student. Para efeito de comparação, o genótipo CE-31 (resistente), tratado apenas com água (CE 0,0), é, também, apresentado. Os valores acima das barras representam a redução (%) do número de ovos em relação ao controle (TE 0,0).

#### 4.5 – DISCUSSÃO

Cada patógeno desenvolve um modo específico para invadir uma planta. Essa invasão pode provocar doenças que produzem sintomas característicos do agente patogênico (Buchanan *et al.*, 2000).

A infecção da planta por nematóides do gênero *Meloidogyne* resulta no aparecimento de sintomas, principalmente nas raízes, como formação de galhas, redução no crescimento, dentre outros. Os sintomas radiculares normalmente são acompanhados por deficiência nutricional que leva à redução no crescimento da planta, amarelecimento e queda das folhas (FIGURA 4.6) e frutos e conseqüente queda na produtividade (Agrios, 2005).

Em culturas importantes para a economia agrícola, os nematóides podem ocasionar perdas consideráveis. Alguns dados estimam que as perdas na agricultura mundial ocasionadas somente por espécies do gênero *Meloidogyne* sejam da ordem de 100 bilhões de dólares por ano, sendo a maioria destas devido à espécie *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood (Agrios, 2005; Lilley *et al.*, 1999 e Ripoll *et al.*, 2003).

Vários métodos de controle dos nematóides são recomendados para várias culturas, métodos estes com baixo nível tecnológico e alto custo que deixam esse controle muitas vezes inviável (Silva, 2005). A busca por uma prática de controle mais eficiente e segura, vem sendo discutida no mundo inteiro. Giebel, em 1982, já especulava que a indução de resistência por tratamento de plantas com químicos seria uma prática viável no futuro. Atualmente, vários estudos com indução de resistência têm mostrado que o uso destes indutores, além de ser um meio prático, aparenta ser mais seguro, não só para o homem como para o ecossistema como um todo, no controle de pragas e doenças (Iriti e Faoro, 2003). Investigações estão sendo feitas no que diz respeito às vias de sinalização, bem como ao potencial da indução de resistência na proteção das plantas contra patógenos (Heil e Bostock 2002).

Durante a invasão dos tecidos vegetais por nematóides, mecanismos naturais de defesa, os quais envolvem ativação de respostas de resistência locais e sistêmicas, são desencadeados na planta atacada (Qiu *et al.*, 1997). Estes mecanismos são acionados pela interação da planta com o patógeno ou através do

contato da mesma com elicitores destas respostas. Por exemplo, a SAR é um mecanismo induzido que protege a planta sistemicamente contra diferentes patógenos (Durrant e Dong, 2004).

Ativadores dessas respostas de defesa estão sendo usados como ferramenta no controle de doenças. BTH, um produto químico, comercialmente vendido como ativador de plantas, possui ação semelhante à do ácido salicílico quando aplicado às plantas antes do ataque do patógeno (Kessmann *et al.*, 1996; Gozzo, 2003).

Embora poucos trabalhos relatem a aplicação do BTH na tentativa de promover indução de resistência em plantas contra nematóides, este composto é um conhecido ativador da SAR, alterando a expressão de genes de resistência em várias espécies de plantas contra diferentes patógenos (Friedrich *et al.*, 1996; Görlach *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996).

A despeito dos poucos trabalhos envolvendo BTH e nematóides, a literatura corrente tem amplamente demonstrado a ação protetora do BTH contra fungos. A aplicação deste produto reduziu o desenvolvimento de *Phytophthora palmivora* em mamão (*Carica papaya* L.) (Zhu *et al.*, 2003) e *Colletotrichum gloeosporioides* em caju (*Anacardium occidentale*) (Lopes e Lucas, 2002). Protegeu sistemicamente, também, plantas de trigo contra infecção causada pelos fungos *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Stadnik e Buchenauer, 2000) e *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*, afetando vários passos do ciclo de vida destes patógenos (Görlach *et al.*, 1996). O progresso da infecção causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* foi diminuído pelo tratamento com BTH em diferentes espécies vegetais (Benhamou e Bélanger, 1998; Rodrigues *et al.*, 2006; Elmer, 2006). Reduções na infecção e no desenvolvimento de *Botrytis cinerea* em plantas de tomate foram observadas em plantas pré-tratadas com BTH. Ainda na relação BTH *versus* fungos, o trabalho de Buzy *et al.* (2004) com plantas de melão mostrou que o tratamento de sementes de melão com BTH foi capaz de ativar mecanismos que propiciaram aumento na resistência das plantas contra os fungos *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Vários trabalhos vêm demonstrando a ação do BTH também na redução de doenças causadas por bactérias (Soylu *et al.*, 2003; Baysal *et al.*, 2004). Pré-tratamento de plantas com BTH reduziu a severidade da doença, bem como o crescimento da bactéria *Clavibacter michiganensis* subespécie *michiganensis* em plantas de tomate (Soylu *et al.*, 2003). O tratamento com o mesmo indutor também

reduziu a infecção causada por *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis* (Lawton *et al.*, 1996) e *Xanthomonas vesicatoria* em plantas de tomate (Cavalcanti *et al.*, 2006).

Proteção ocasionada pelo pré-tratamento de plantas com BTH tem sido relatada contra subseqüente ação de vírus. A aplicação de BTH sete dias antes da inoculação protegeu plantas de tomate contra as necroses causadas pelo vírus *Cucumber mosaic virus* (CMV-Y) (Anfoka, 2000). Plantas de *Arabidopsis* tratadas com BTH mostraram resistência à infecção causada por *Turnip crinkle virus* (TCV) (Lawton *et al.*, 1996).

Na realidade, poucos são os trabalhos que têm relatado a ineficácia do BTH em conferir proteção de plantas (Ishii *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2004). Este baixo número de resultados negativos tem justificado o emprego do BTH como padrão positivo de proteção de plantas contra patógenos em trabalhos comparativos onde se procura novos indutores de resistência (Schweizer *et al.*, 1999; Orober *et al.*, 2002; Cavalcanti, 2005).

No presente trabalho, foi mostrado que uma única aplicação foliar de BTH, nas concentrações de 0,3 e 0,5 mM, em condições de casa de vegetação, não causou efeito fitotóxico (FIGURA 4.8) aparente no desenvolvimento das plantas, mas foi capaz de reduzir o número de galhas em plantas decorridos 30 dias de inoculação com *M. incognita*, raça 1 (FIGURAS 4.7 e 4.9). O mesmo não ocorreu para a avaliação feita pela contagem de massas de ovos (FIGURA 4.10), já que a diferença das plantas tratadas com as plantas controles não foi significativa. Sessenta dias após inoculação, o tratamento com 0,5 mM de BTH reduziu o número de ovos em 34,2% (FIGURA 4.11), quando comparado com plantas não tratadas. Chinnasri *et al.* (2003) mostraram que a aplicação foliar de BTH (0,24 mM) foi capaz de diminuir em até 50% a produção de ovos dos nematóides *M. javanica* em feijão-de-corda e *Rotylenchulus reniformis* em soja.

Apesar do tratamento com BTH ter reduzido o número de massas de ovos e o número de ovos de *M. incognita*, raça, 1, em raízes do genótipo suscetível, TE 97 411-1E, os números de massa de ovos e ovos por sistema radicular ainda são muitos superiores em relação aos apresentados pelo genótipo CE-31 (resistente).

Aplicação foliar de BTH em videira, cultivada em condições de casa de vegetação, reduziu o desenvolvimento e a deposição de ovos por *Meloidogyne* spp. (Owen *et al.*, 2002). Diferentemente, trabalhando com nematóide do cisto, Rocha *et al.* (2000) não observaram diferenças significativas no número de fêmeas de

*Heterodera glycines* no sistema radicular de soja, no número de cistos no solo e no número médio de ovos por cisto quando as plantas foram tratadas com BTH por pulverização na parte aérea ou aplicação do produto como rega no solo.

Outros compostos químicos têm sido usados como indutores do mecanismo de defesa em plantas contra a infecção causada por nematóides das galhas e de cisto. Pandey e Kalra (2005) observaram que os compostos, isonicotinamida, ácido 2-cloronicotínico, ácido 5-nitrosalicílico, ácido 4-clorosalicílico, ácido DL-2 amino butírico, ácido O-acetil salicílico, ácido 4-amino salicílico e ácido salicílico foram capazes de reduzir a população e a reprodução de *M. incognita* em *Matricaria recutita*. Pulverização da parte aérea de plantas de tomateiros ou encharcamento do solo com ácido DL- $\beta$ -amino-*n*-butírico (BABA) reduziram o número de galhas e ovos depositados. O tratamento também diminuiu o desenvolvimento dos nematóides e o processo de infecção nos tecidos vegetais (Oka *et al.*, 1999).

Na avaliação da infecção causada pelo nematóide do cisto, *Heterodera avenae*, em plantas de trigo tratadas com BABA, foi observada redução no número de cistos e no desenvolvimento de nematóides nas raízes das plantas (Oka e Cohen 2000).

Em feijão-de-corda, estudos com aplicação do BTH têm demonstrado sua eficiência no controle de doenças ocasionadas por fungos. O uso do BTH, cinco dias após germinação, proporcionou controle da murcha de fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*) nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206 (Rodrigues *et al.*, 2006). Latunde-Dada e Lucas (2001) obtiveram plantas com maior resistência à antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum destructivum*, quando trataram sementes da cultivar suscetível de feijão-de-corda com BTH.

Um dos requisitos necessários para que um dado composto seja considerado indutor de resistência é que o mesmo não apresente propriedades nocivas diretamente aos patógenos (Kessmann *et al.*, 1994). Alguns trabalhos têm mostrado que o BTH não exibe atividade antimicrobiana, particularmente a fungos e bactérias, mesmo, quando aplicado em concentrações consideradas altas (Friedrich *et al.*, 1996; Novartis, 2002). Em seus experimentos, Friedrich *et al.* (1996) não encontraram atividade antifúngica do BTH em 18 espécies de fungos avaliadas.

No presente trabalho, alterações significativas nos índices de mobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita* raças 1 e 4 não foram observadas quando o BTH foi aplicado sobre estes juvenis nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0

mM, em nenhum dos tempos avaliados: 12, 24 e 48 horas após aplicação (TABELAS 1 e 2). Owen *et al.* (2002) apresentaram resultados semelhantes onde nenhum efeito foi observado no número de juvenis que penetraram nas raízes de plantas de tomate quando nematóides *Meloidogyne* spp foram colocados em contato com diferentes concentrações de BTH (0,005; 0,05; 0,1 e 0,25 mM, durante 24 horas) e, depois, utilizados para inocular as plantas. O contato direto com BTH também não afetou a mobilidade de *Meloidogyne javanica* e *Rotylenchulus reniformis* ou a penetração de J2 de *M. javanica* em raízes de feijão-de-corda (Chinnasri *et al.*, 2003).

#### 4.6 – CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a utilização do BTH no controle do nematóide *M. incognita* em feijão-de-corda pareceu ser uma estratégia viável.

Entretanto, se a aplicação do BTH for feita de modo repetitivo, em intervalos regulares, ou realizada em consórcio com outras medidas de controle do nematóide, talvez seja possível a obtenção de maior grau de proteção e, conseqüentemente, redução nas perdas econômicas na produção do feijão-de-corda atribuídas à ação deste patógeno.

#### 4.7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. (2005). **Plant pathology**. 5ª Edição. Estados Unidos da América, Elsevier Academic Press.
- ANDRADE, N. C. (2003). Resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] a *Meloidogyne incognita* (Kafoid & White) Chitwood: Aspectos anatômicos, bioquímicos e moleculares. **Tese de Doutorado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza.
- ANFOKA, G.H. (2000). 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** 19, 401-405.
- BAYSAL, O., ZELLER, W. (2004). Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against Fire Blight (*Erwinia amylovora*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 65, 305–315.
- BENHAMOU, N., BÉLANGER R. R. (1998). Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**. 118, 1203-1212.
- BEZAWADA, C., SAHA, S., JENKINS, J.N., CREECH, R.G., McCARTY, J.C. (2003). Breeding and Genetics, SSR Marker(s) Associated with root-knot nematode resistance gene(s) In cotton. **The Journal of Cotton Science**, 179-184.
- BUCHANAN, M., GRUSSEM, W., JONES, R. (2000). **Biochemistry e Molecular Biology of Plants**. Editora American Society of Plant Physiologists. Rockville USA, 1367p.
- BUZI, A., CHILOSI, G., DE SILLO, D., MAGRO, P. (2004). 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. Phytopathology** 152, 34-42.

BYRD Jr, D. W., KIRKPATRICK, T., BARKER, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology** 15 (1), 142-143.

CAPISTRANO, G. G. G. (2004). Análise comparativa de genótipos feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] quanto ao grau de infestação com *Meloidogyne incognita* (Kafoid & White) Chitwood (raça 3): Prospecção de marcadores moleculares de resistência através de RAPD. **Tese de Doutorado em Bioquímica**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., ZACARONI, A.B., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., COSTA, J.C.B., SOUZA, R.M. (2006). Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). **Fitopatologia Brasileira** 31(4), 372-380.

CAVALCANTI, F. R. (2005). Resistência induzida a *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro e *Verticillium dahliae* em cacauzeiro por extratos naturais: Caracterização bioquímica, fisiológica e purificação parcial de eliciadores protéicos. **Tese de Doutorado**. Departamento de Fitopatologia, UFLA, Lavras-MG.

CHINNASRI, B., SIPES, B. S., SCHMITT, D. P. (2003). Effects of acibenzolar-s-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology** 35 (1), 110-114.

COIMBRA, J.L., CAMPOS, V.P. (2005). Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira** 30(3), 232-238.

DURRANT, W. E.; DONG X. (2004) Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology** 42, 185-209.

DUTRA, M.R., CAMPOS, V.P., ROCHA, F.S., SILVA, J.R.C., POZZA, E.A. (2006) Manejo do solo e da irrigação no controle de *Meloidogyne incognita* em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira** 31(4), 407-407.

ELMER, W.H. (2006). Effects of acibenzolar-S-methyl on the suppression of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection** 25, 671-676.

FREIRE-FILHO, F. R., LIMA, J. A. A., RIBEIRO, V. Q. (2005). Feijão-caupi – Avanços tecnológicos. Brasília-DF, Embrapa Informação Tecnológica.

FREITAS, L.G., OLIVEIRA, R.D.L., FERRAZ, S. **Introdução a nematologia**, UFV Viçosa, 1999.

FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUTRELLA M., MEIER B., DINCHER S., STAUB T., UKNES S., METRAUX J. P., KESSMANN H., RYALS, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. **The Plant Journal**. 10(1), 61-70.

GIEBEL, J. (1982). Mechanism of resistance to plant nematodes. *Annual Rev. Phytopathol* 20, 257-279.

GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., RYALS J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell** 8, 629-643.

GOZZO, F. (2003). Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 51, 4487-4503

GRUNDLER, F. M. W.; BÖCKENHOFF, A. Physiology of nematode feeding and feeding sites. In: Owen, K.J., Green, C.D., Deverall, B.J. (2002). A Benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology** 31, 47-53.

GUERENA, M. (2006). Nematodes: Alternative Controls. **ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service** 1-800-346-9140 • [www.attra.ncat.org](http://www.attra.ncat.org).

- HEIL, M., BOSTOCK, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany** 89, 503-512.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of University of California, Berkeley**, 347, 139.
- HUSSEY, R. S., BARKER, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter** 57, 1025-1028.
- IRITI, M., FAORO, F. (2003). Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology** 151, 171–180.
- ISHII, H., TOMITA, Y., HORIO, T., NARUSAKA, Y., NAKAZAWA Y., NISHIUMURA, K., IWAMOTO, S. (1999). Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and japanese pear diseases. **European Journal Plant Pathology** 105, 77-85.
- JANSEN, M., SLUSARENKO, A. J., SCHAFFRATH, U. (2006) Competence of roots for race-specific resistance and the induction of acquired resistance against *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant Pathology** 7 (3), 191-195.
- KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNES, S., RYALS, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology** 32, 439-459.
- KESSMANN, H., STAUB, T., LIGON, J., OOSTENDORP, M., RYALS, J. (1994). Activation of sytemic acquired disease resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology** 100, 359-369.
- LATUNDE-DADA, A.O., LUCAS, J.A. (2001). The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] seedlings for rapid induction of resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 58, 199-208.

- LAWTON, K., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESMANN, H., STAUB, T., RYALS, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **Plant Journal** 10, 71-82.
- LILLEY, C. J., DEVLIN, P., URWIN, P. E., ATKINSON H. J. (1999). Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. **Parasitology Today** 10, 414-417.
- LOPEZ, A. M. Q., LUCAS, J. A. (2002). Effects of plant defence activators on anthracnose disease of cashew. **European Journal of Plant Pathology** 108, 409-420.
- MATOS, M.S., MATOS, P.F. (1988). Laboratório clínico médico-veterinário. 2ª edição, **Editora Atheneu**. Rio de Janeiro.
- McBRIDE, R.G., MIKKELSEN, R.L., BARKER, K.R. (1999). A comparison of three methods for determining root-knot nematode infection of cotton roots. **Nematropica** 29(2), 147-151.
- McCLURE, M. A., KRUK, T. H., MISAGHI, I. (1972). A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs. **Journal Paper of the Arizona Agricultural** 2014, 230.
- NOVARTIS. 'Nature created the concept.' (Novartis Crop Protection AG: Basle) In: Owen, K.J., Green, C.D., Deverall, B.J. (2002). A Benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology** 31, 47-53.
- ODJAKOVA, M., HADJIIVANOVA, C. (2001). The complexity of pathogen defense in plants. Bulg. **Journal Plant Physiology** 27(1-2), 101-109.
- OKA, Y., COHEN, Y. (2000). Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-β-amino-n-butiric acid. **European Journal of Plant Pathology** 107, 217-227.

OKA, Y., COHEN, Y., SPIEGEL, Y. (1999). Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid. *Nematology* 89 (12), 1138-1143.

OROBER, M. JÜRGEN, S., BUCHENAUER, H. (2002). Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. **European Journal of Plant Pathology** 108, 345-353.

OWEN, K.J., GREEN, C.D., DEVERALL, B.J. (2002). A Benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology** 31, 47-53.

PANDEY, R., KALRA, A. (2005) Chemical activators: A novel and sustainable management approach for *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood in *Chamomilla recutita* L. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 38 (2), 107-111.

PONTE, J. J. (1977). Nematóides das galhas: Espécies ocurrentes no Brasil e seus hospedeiros. Mossoró: ESAM. **Tese de Livre Docência**.

QIU, J., HALLMANN, J., KOKALIS-BURELLE, N., WEAVER, D. B., RODRIGUE-KABANA, R., TUZUN, S. (1997). Activity and differential induction of chitinase isozymes in soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. **Journal of Nematology** 29 (4), 523-530.

RIPOLL, C., FAVERY, B., LECOMTE, P., VAN DAMME, E, PEUMANS W., ABAD, P., JOUANIN, L. (2003). Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science** 164, 517-523.

ROCHA, M.R., CASTRO, R.M., PINA, R.C., MARTINI, A.L. (2000). Efeito do acibenzolar-s-methyl (benzothiadiazole), como indutor de resistência sistêmica em soja (*Glycine max* cv. Cristalina), sobre *Heterodera glycines*. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 30(2), 35-38.

RODRIGUES, A.A.C., NETO, E.B., COELHO, R.S.B. (2006). Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: Eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira** 31(5), 292-299.

ROMEIRO, R. S. (2002) Indução de resistência em plantas a patógenos. Editora Viçosa-MG, UFV.

SCHEWEIZER, P., SCHLAGENHAUF, E., SCHAFFRATH, U., DUDLER, R. (1999). Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance, and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). **European Journal Plant Pathology** 105, 659-665.

SILVA, G.S. (2000). Ocorrência e controle de fitonematóides no feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. In: **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 263p.

SILVA, G. S. (2005). Nematóides. In: Freire-Filho, F. R., Lima, J. A. A., Ribeiro, V. Q. Feijão-caupi – Avanços tecnológicos. Brasília-DF, Embrapa Informação Tecnológica.

SILVA, G.H., OLIVEIRA, D.F., CAMPOS, V.P. (2002). Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira** 27(6).

SILVEIRA, J.A.G., COSTA, R.C.L., OLIVEIRA, J.T.A. (2001). Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. **Brasilian Journal of Microbiology** 32, 187-194.

SOARES, R. M., MARINGONI, A.C., LIMA, G. P.P. (2004). Ineficiência de Acibenzolar-S-Methyl na Indução de Resistência de Feijoeiro Comum à Murcha-de-Curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**. 29 (4), 373-377.

SOYLU, S., BAYSAL, O., SOYLU, E. M. (2003). Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science** 165, 1069-1075.

SPARLA, F., ROTINO, L., VALGIMIGLI, M.C., PUPILLO, P., TROST, P. (2004). Systemic resistance induced by benzothiadiazole in pear inoculated with the agent of fire blight (*Erwinia amylovora*). **Scientia Horticulturae** 101, 269-279.

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

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.-P. (1997) Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, 35, 235-270.

SYNGENTA (2007). Disponível em: [www.syngenta.com.br](http://www.syngenta.com.br) Acessado em 26/02/2007.

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. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell** 3, 1085-1094.

WILLIAMSON, V.M., KUMAR, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics** 22(7).

ZHU, Y. J., QIU, X., MOORE, P. H., BORTH, W., HU, J., FERREIRA, S., ALBERT, H. H. (2003) Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 63, 237–248.

## CONCLUSÃO FINAL

O uso do indutor de defesa vegetal BTH, permitiu a redução da severidade da infecção causada pelo nematóide *Meloidogyne incognita*, raça 1 em feijão-de-corda, provavelmente por desencadear mecanismos de defesa do vegetal, visto que o mesmo não possui efeitos deletérios ao patógeno. Sendo assim, este produto atrelado a outras técnicas de manejo poderá ser capaz de atender às necessidades de uma agricultura com maior produtividade, qualidade e menor risco ambiental. Contudo, estudos preliminares relativos ao modo de aplicação e concentração do produto, devem ser realizados para evitar efeitos de fitotoxicidade no vegetal.