



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

EMANUEL ALVES BEZERRA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS COMPARATIVAS DE GENÓTIPOS SUSCETÍVEIS E
RESISTENTES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]
DESAFIADOS COM O VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI (CPSMV)**

FORTALEZA – CEARÁ

2016

EMANUEL ALVES BEZERRA

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS COMPARATIVAS DE GENÓTIPOS SUSCETÍVEIS E
RESISTENTES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]
DESAFIADOS COM O VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI (CPSMV)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

FORTALEZA - CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469r Bezerra, Emanuel Alves.

Respostas bioquímicas comparativas de genótipos suscetíveis e resistentes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] desafiados com o vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV) / Emanuel Alves Bezerra. – 2016.

91 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Me. José Tadeu Abreu de Oliveira.

1. Feijão-de-corda. 2. CPSMV. 3. Proteínas de defesa. 4. Transcritos. I. Título.

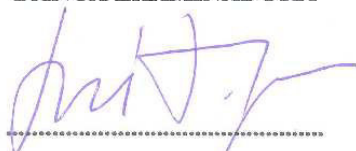
CDD 572

EMANUEL ALVES BEZERRA

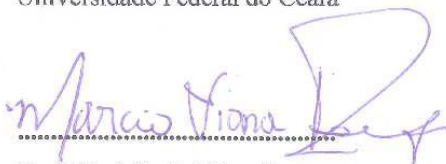
**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS COMPARATIVAS DE GENÓTIPOS SUSCETÍVEIS E
RESISTENTES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]
DESAFIADOS COM O VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI (CPSMV)**

Dissertação submetida à Coordenação
do Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará



Prof.ª Dr.ª Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos dadas (vida, saúde, oportunidades, amor) e ao Seu Filho Jesus Cristo por toda interseção feita junto ao Seu Pai para que essas bênçãos pudessem ser nos mandada.

Aos meus pais pelo apoio, educação, ajuda. Minha esposa, Solange, pelo apoio, ajuda, compreensão. Ao meu irmão Hélio, pelo apoio em Fortaleza, à toda minha família.

Ao Professor Dr José Tadeu Abreu de Oliveira pela orientação sempre próxima, amizade, compreensão, pelos valiosos ensinamentos acadêmicos e conselhos profissionais.

Ao Professor Dr Sebastião do Laboratório de Sementes da UFC e ao seu bolsista André pelas sementes de feijão-de-corda, cedidas para a realização deste estudo.

A Ana Lúcia funcionária da EMBRAPA Meio Norte Piauí, pelas sementes de feijão-de-corda, cedidas para a realização deste estudo.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (**DBBM**) e do Departamento de Fitotecnia pelos valiosos conhecimentos transmitidos.

Aos colegas de laboratório: Larissa, Gabriela, Ivna, Pedro, Ana Luíza, Ana Lídia, Tiago, Rodolpho, Fredy, Dell e Érica, pela amizade, conselhos.

Aos colegas de laboratório externos: Roberto e João Victor pela amizade e cooperação.

Aos colegas de Pós-Graduação em Bioquímica pela convivência sempre agradável.

Aos colegas de trabalho da escola municipal de Crateús Antônio Anísio da Frota – CAIC: Ricardo, diretor em 2015, Daniele coordenadora, Vilberlândia, diretora em 2016, e a Viviane, Professora que me substituía em minhas ausências na escola, pelos apoios e suportes profissionais.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes Instituições:

Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências (**DBBM-UFC**), local onde esta pesquisa foi realizada.

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (**CAPES**), pela bolsa de Pós-Graduação oferecida ao autor, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Celular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**FUNCAP**), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Celular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] tem grande importância socioeconômica no Norte e Nordeste brasileiro e em vários outros países da América do Sul e Latina, África e Ásia. Apesar de sua rusticidade e elevada resistência natural a muitas doenças, o Vírus do Mosaico Severo do Caupi (CPSMV), pertencente à família *Comoviridae*, apresenta grande destaque por ser a virose que mais acomete essa cultura no país. Embora existam genótipos resistentes ao vírus, não se sabe quais os mecanismos de defesa envolvidos. Nesse projeto, um estudo comparativo entre genótipos de feijão-de-corda, resistentes e suscetíveis ao CPSMV, foi conduzido, tendo como abordagem experimental a avaliação de atividades de enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa de plantas, com a finalidade de fornecer informações bioquímicas que ajudem a explicar por que há genótipos de feijão-de-corda resistentes e suscetíveis ao CPSMV. Assim, diferenças nas atividades de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), e as enzimas fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidase de fenóis (POX) e polifenol oxidase (PPO), envolvidas com o metabolismo de fenóis, foram analisadas. Diferenças quantitativas de compostos fenólicos, íon superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram, também, avaliados. Após as folhas secundárias terem sido inoculadas com o CPSMV, ou apenas injuriadas com o abrasivo carborundum (controles), elas foram coletadas nos tempos 0, 6, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) e as análises bioquímicas realizadas nos extratos proteicos obtidos. Além disso, a síntese de transcritos relativos à SOD, CAT e APX foi avaliada 6 HAI por meio da reação quantitativa em cadeia da polimerase (RT-qPCR), comparando-as com as atividades registradas dessas enzimas. Nas plantas infectadas com o CPSMV em relação as não infectadas (controles), os genótipos resistentes demonstraram maiores atividades da POX, PPO, PAL, SOD e baixas atividades da CAT e APX. O conteúdo de O_2^- , H_2O_2 e compostos fenólicos apresentaram-se elevados em alguns tempos durante a infecção nos genótipos resistentes, sendo observado o contrário nas atividades enzimáticas e conteúdo de O_2^- , H_2O_2 e compostos fenólicos dos genótipos suscetíveis. A expressão dos transcritos da CAT acompanhou a atividade da catalase. No entanto, apenas em alguns genótipos os transcritos da SOD e APX acompanharam a atividade de suas enzimas. Os resultados sugerem a participação da SOD, CAT, APX, PAL, POX, PPO, associados com os teores de superóxido, peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos nos mecanismos de resistência/susceptibilidade do feijão-de-corda à infecção pelo CPSMV.

Palavras-chaves: Feijão-de-corda, CPSMV, proteínas de defesa, transcritos.

ABSTRACT

COMPARATIVE BIOCHEMICAL RESPONSES OF RESISTANT AND SUSCEPTIBLE COWPEA (*Vigna unguiculata* [L.] WALP.) GENOTYPES CHALLENGED WITH COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS (CPSMV)

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) WalP.] has great socioeconomic importance in the North and Northeast Brazil, other countries of South and Latin America, Africa, and Asia. Although its rusticity and high natural resistance to most diseases, cowpea severe mosaic virus (CPSMV), which belongs to the family Comoviridae, has great importance because its severity and extensive damage and loss it causes in cowpea. Although there are resistant genotypes to CPSMV, it is not well understood the mechanisms involved in defense. This comparative study was conducted with two resistant and two susceptible cowpea genotypes to shed light on the mechanisms of susceptibility and resistance to CPSMV. Thus, differences in the enzyme activities related to the oxidative stress involving superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase ascorbate (APX), in addition to enzymes of the phenol metabolism as phenylalanine ammonia-lyase (PAL), guaiacol peroxidase (POX), and polyphenol oxidase (PPO) were analyzed. Quantitative differences in phenolic compounds, superoxide ion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) were also evaluated. After inoculation with CPSMV, or only with the abrasive carborundum (controls), the secondary leaves of each genotype were collected at 0, 6, 24, 48, and 72 hours after inoculation (HAI) and the biochemical analyzes performed. In addition, the transcript levels of SOD, CAT, and APX were evaluated at 6 HAI, by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). In CPSMV infected resistant cowpea plants compared to the respective controls higher POX, PPO, PAL, SOD, but low CAT and APX activities were observed. Moreover, O_2^- , H_2O_2 and phenolic compounds showed higher contents than those of the respective controls at some time points after inoculation of the resistant cowpea genotypes with CPSMV. Opposite responses regarding to these above biochemical parameters were observed for the susceptible genotypes. Expression of the CAT transcript was in agreement with the CAT activity at 6 HAI. However, for only some cowpea genotypes the APX transcript synthesis at 6 HAI was in agreement with the enzyme activity. Nevertheless, the results suggest participation of SOD, CAT, APX, PAL, POX, PPO, associated with phenolic compound, O_2^- , and H_2O_2 levels in the mechanisms of resistance/susceptibility of the cowpea to CPSMV infection.

Keywords: Cowpea, CPSMV, defense proteins, transcripts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da estrutura genômica do CPSMV	07
Figura 2 – Mecanismos de resistência vegetal.	10
Figura 3 – Tipos de elicitores envolvidos na defesa vegetal.	11
Figura 4: Reações catalisadas pelas dismutases de superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX) e catalases (CAT).....	17
Figura 5. Folhas secundárias de feijão-de-corda coletadas 48 (A) e 72 (B) horas após inoculação (HAI) com CPSMV	29
Figura 6. Presença do CPSMV em folhas secundárias de feijão-de-corda 6 e 72 HAI.	30
Figura 7. Conteúdo do íon superóxido (O_2^-) em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV	31
Figura 8. Folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV, mostrando a presença do íon superóxido (zonas azuis), em 0 HAI.....	32
Figura 9. Atividade de dismutase do superóxido (SOD) em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV	33
Figura 10. Atividade de catalase (CAT) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV.	34
Figura 11. Atividade de peroxidase do ascorbato (APX) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV	35
Figura 12. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV	36
Figura 13. Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,2%, m/v), dos RNAs totais extraídos das folhas secundárias de feijão-de-corda.	37
Figura 14. Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,2%, m/v), dos cDNAs resultantes da amplificação, por RT-PCR, do gene <i>PhaFbox</i> (constitutivo) das amostras das folhas secundárias de feijão-de-corda.	38
Figura 15. Expressão relativa do gene <i>CuZnSODII</i> 6 HAI com o CPSMV.....	39
Figura 16. Expressão relativa do gene <i>APX1</i> , 6 HAI com CPSMV.....	40
Figura 17. Expressão relativa do gene <i>CAT1</i> , 6 HAI com CPSMV.....	41
Figura 18 Reação de fenilalanina amônia liase (PAL) na via do shiquimato/arogenato.....	49
Figura 19 Reação da peroxidases de fenóis (POXs).	50
Figura 20 Reação de polifenoloxidasas (PPOs).	50

Figura 21. Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV	54
Figura 22. Atividade de peroxidase de fenóis (POX) em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV	55
Figura 23. Atividade de polifenol oxidase (PPO) em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV	56
Figura 24. Conteúdo de fenóis totais em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV	57
Figura 25. Possíveis eventos envolvidos na resistência de genótipos de feijão-de-corda ao CPSMV.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais doenças do feijão-de-corda no Brasil	3
Tabela 2 - Alguns vírus que infectam o feijão-de-corda	5
Tabela 3 - Iniciadores (<i>primers</i>) usados para anelamento com genes alvos e genes de referência	27

LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

APX	Peroxidase do ascorbato
CAT	Catalase
CPSMV	Vírus do Mosaico Severo do Caupi
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
FAO	Food and Agricultural Organization
HAI	Horas após inoculação
NBT	Nitroazul de tetrazólio
PAL	Fenilalanina Amônia Liase
PEG	Poli(etil)enoglicol
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonil
PPO	Polifenoloxidase
POX	Peroxidase de fenóis
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SOD	Dismutase de superóxido
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Hiperoxia	Excesso de oxigênio
Hipoxia	Baixo teor de oxigênio
Cultigrupo	Varição de subespécie considerando parâmetros botânicos

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Feijão-de-corda	1
1.2. Doenças do feijão-de-corda.....	2
1.3. Doenças ocasionadas por vírus ao feijão-de-corda.....	5
1.4. <i>Cowpea severe mosaic virus</i> – CPSMV.....	7
1.5. Respostas de defesa de plantas contra patógenos.....	9
1.6. Respostas do feijão-de-corda ao CPSMV.....	12
2. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Geral	15
3.2. Específicos	15
CAPÍTULO I	
CINÉTICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-CORDA RESISTENTE E SUSCETIVEIS, DESAFIADOS COM O CPSMV.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	19
2.1. Material biológico	19
2.2. Cultivo	19
2.3. Inoculação do CPSMV	20
2.4. Obtenção do extrato enzimático.....	20
2.5. Dosagem de proteínas solúveis totais.....	21
2.6. Determinação da atividade de Catalase (CAT)	21
2.7. Determinação da atividade de Peroxidase do ascorbato (APX).....	21
2.8. Determinação da atividade de Dismutase de superóxido (SOD).....	22
2.9. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio	22

2.10. Detecção histoquímica de superóxido em folhas de feijão-de-corda.....	23
2.11. Determinação do teor de superóxido	23
2.12. Delineamento estatístico.....	23
2.13. Extração de RNA total	24
2.14. Integridade do RNA total	24
2.15. RT-PCR	25
2.16. RT-PCR semiquantitativa	25
2.17. RT-qPCR.....	26
3. RESULTADOS	28
3.1. Análise das atividades enzimáticas	28
3.2. Íon superóxido: análises quantitativa e qualitativa.....	30
3.3. Atividade da dismutase de superóxido (SOD)	32
3.4. Atividade da catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).....	33
3.5. Teor de peróxido de hidrogênio	36
3.6. Análise dos transcritos para SOD, CAT e APX.....	37
3.6.1 Integridade do RNA total e qualidade da biblioteca de cDNA	37
3.6.2 RT-qPCR	39
4. DISCUSSÃO	41
4.1. Análise da sintomatologia e presença do CPSMV	41
4.2. Teor do íon superóxido (O ₂ ⁻)	42
4.3. Atividades de SOD, CAT, APX e expressão gênica.....	43
4.4. Teor de H ₂ O ₂	46

CAPÍTULO II

CINÉTICA DE ENZIMAS RALACIONADAS AO METABOLISMO DE FENÓIS EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-CORDA RESISTENTES E SUSCETIVEIS, DESAFIADOS COM CPSMV	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	51
2.1. Determinação da atividade de PAL	51
2.2. Determinação da atividade de POX.....	52
2.3. Determinação da atividade de PPO	52
2.4. Determinação do teor de fenóis totais.....	52
3. RESULTADOS	53

3.1. Atividade da PAL.....	53
3.2. Atividade da POX e PPO.....	54
3.3. Teor de compostos fenólicos	56
4. DISCUSSÃO	57
4.1. Atividade da PAL	57
4.2. Atividade da POX e PPO	58
4.3. Teor de compostos fenólicos	60
CONSIDERAÇÕES GERAIS FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Feijão-de-corda

O feijão-de-corda é um vegetal de origem africana tendo sido introduzido no Brasil pelos portugueses no período colonial. O Estado da Bahia foi o primeiro local brasileiro onde se cultivou o feijão-de-corda, sendo posteriormente difundido para o restante do país (Freire Filho, 1988). A planta possui a seguinte classificação científica: ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* L. Walp. e subespécie *unguiculata*. A subespécie *unguiculata* é subdividida em quatro cultigrupos (*unguiculata*, *sesquipedales*, *biflora* e *textilis* (Padulosi; NG, 1997)). A espécie *Vigna unguiculata* L. Walp. possui alguns nomes comuns que variam de acordo com a região. No Norte e Nordeste do Brasil é denominado de: feijão macassar; feijão-de-corda; feijão-de-praia; feijão da colônia; feijão caupi. Nesse trabalho, a denominação de feijão-de-corda será preferida, tendo em vista assim ser mais conhecido no Ceará e vários outros estados do Nordeste brasileiro.

O feijão-de-corda possui grande importância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em 2007, a área mundial cultivada foi de aproximadamente 12,5 milhões de hectares com o continente africano contribuindo com 87,2%, o americano com 11,2%, o asiático com 1,3% e o europeu com 0,06% (FAO, 2009). No Brasil, a área média de seu cultivo é de 1,3 milhões de hectares, sendo sua produtividade média de cerca 366 Kg/ha (CONAB 2012). Na região Nordeste do Brasil, onde esse feijão fornece alimento para mais de 25 milhões de pessoas (Singh *et al.*, 2002), a colheita de suas vagens ocorrem tanto na fase de plena maturação e, precocemente, ainda imaturo, sendo o produto denominado "feijão-verde", e largamente usado na culinária regional.

A produtividade média do feijão-de-corda é baixa em função do grau tecnológico empregado, pois é cultivado, predominantemente, por pequenos agricultores, numa exploração de subsistência, sem a adoção de práticas adequadas, como irrigação, controle de pragas e doenças.

Devido ao seu baixo custo de produção, a FAO aponta que a cultura é uma das melhores alternativas para o aumento da oferta de alimento básico para as populações de baixa renda de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Philips *et al.*, 2003). Esse tipo de feijão constitui a base alimentar de muitas populações rurais devido à sua fácil adaptação a

solos de baixa fertilidade, ao seu elevado teor de proteínas, carboidratos e minerais, além da tolerância relativa a períodos de seca prolongada.

Apesar de sua rusticidade, a cultura sofre a ação de alguns fatores bióticos capazes de reduzir a sua produtividade e até mesmo, em alguns casos específicos, inviabilizar sua produção.

1.2 Doenças do feijão-de-corda

Dentre os vários fatores que limitam a produção do feijão-de-corda no Brasil, encontram-se as doenças causadas por agentes patogênicos (Tabela 1), que influenciam na qualidade e na quantidade de feijão produzida. Nesse contexto, são destaques a herbivoria (insetos e nematoides) e as doenças causadas por agentes patogênicos (vírus, bactérias e fungos), sendo que os vírus e fungos agrupam o maior número de espécies nocivas à esta cultura (Athayde Sobrinho *et al.*, 2000).

Do ponto de vista das doenças do feijão-de-corda causadas por fungos, existe, atualmente, um grande número de espécies fitopatogênicas identificadas. Entretanto, o baixo impacto econômico representado pela maior parte das doenças causadas por estes fitopatógenos remete-os a uma posição secundária no ponto de vista dos investimentos em pesquisas científicas. Nesse grupo de patógenos, destacam-se: a mancha de cercospora ou cercosporiose (*Cercospora cruenta* e *C. canescens*); a podridão do colo (*Pythium aphanidermatum*); a mela, ou murcha da teia micéial (*Rhizoctonia solani*); a sarna (*Sphaceloma sp.*); a ascochyta (*Ascochyta Phaseolorum*); o carvão (*Entyloma Vignae*, *Protomyopsis Phaseoli*); a ferrugem (*Uromyces Vignae*); a murcha do fusário (*Fusarium Oxysporum*); e a antracnose (*Colletotrichum Lindemuthianum*) (Rios, 1988; Athayde Sobrinho *et al.*, 2000; Fernandes, 2004).

Como já referido acima, as viroses são as mais importantes dentre as doenças que afetam essa cultura, dadas às dificuldades de controle e a forma de disseminação. Segundo Lima *et al.* (2005), os principais vírus que atacam o feijão-de-corda pertencem aos gêneros: *Comovirus* (vírus do mosaico severo do caupi, CPSMV), *Potyvirus* (vírus do mosaico do caupi transmitido pelo pulgão, CABMV; vírus do mosaico do caupi variedade “blackeye”, BICMV; vírus da faixa verde das nervuras, CGVBV; vírus do mosaico rugoso do caupi; vírus do mosqueado severo do caupi); *Geminivirus* (mosaico dourado do caupi) e *Cucumovirus* (vírus do mosaico do pepino, CMV), todos, de grande importância econômica, tendo em vista

os danos causados na produtividade de grãos (Lima e Santos, 1988). Os danos causados pelo CPSMV, da família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*, por exemplo, podem ser significativos, dependendo do cultivar plantado e da época do ano que se iniciarem os primeiros focos da doença.

Tabela 1 - Principais doenças do feijão-caupi no Brasil, incluindo dados sobre sua etiologia, e descrição de sintomas relatados na literatura

Doença	Etiologia	Sintomas
Agente(s) causador(es)		
Mosaico Severo do Caupi	Vírus: CPSMV, <i>Cowpea Severe Mosaic Virus</i>	Redução drástica do crescimento, necrose de brotos foliares e florais
Potyvirus	Vírus: BICMV, <i>Blackeye Cowpea Mosaic Virus</i> CABMV, <i>Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus</i>	Mosaico intenso do limbo foliar, distorção de folhas e redução acentuada do crescimento
Mosaico Dourado do Caupi	Vírus: CPGMV, <i>Cowpea Golden Mosaic Virus</i>	Distorção de folhas e redução acentuada do crescimento
Faixa Verde das Nervuras	Vírus: CGVVBV, <i>Cowpea Green Vein Banding Virus</i>	Escurecimento das nervuras, queda de folhas, redução do crescimento
Crestamento, Mancha ou Cancro Bacteriano	Bactéria: <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vignicola</i> (Burkholder) Dye	Lesões com centro necrosado e borda alaranjada. Comum em áreas úmidas e irrigadas
Meloidoginose	Nematoide: <i>Meloydogyne</i> spp.	Galhas localizadas nas raízes, deformação do sistema radicular.
Ferrugem	Fungo: <i>Uromyces appendiculatus</i> (Pers.) Unger	Pústulas cor de ferrugem no limbo foliar e na base do pecíolo
Cercosporioses	Fungos: <i>Mycosphaerella cruenta</i> Lathan., <i>Pseudocercospora cruenta</i> (Sacc.) Deigtom e <i>Cercospora canescens</i> Ellis e Martin	Manchas nos folíolos, lesões irregulares, geralmente angulosas
Sarna	Fungo: <i>Elsinoe phaseoli</i> Jenk.	Manchas brancas ou perfuradas nos folíolos
Mela	Fungo: <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk. (<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn)	Lesões circulares de cor parda, com formação de teia micelial que interliga folhas entre si e com outras partes da planta.

Fontes: Pio-Ribeiro e Assis-Filho, (1997); Barreto, (1999); Rocha *et al.*, (2003).

Dentro do grupo de doenças bacterianas do feijão-de-corda, apenas três grupos, as mais disseminadas, merecem ser referidas: a mancha bacteriana (*Xanthomonas vignicola*); a pústula bacteriana (*Xanthomonas sp.*) e o fogo-selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (Rios, 1988).

O feijão-de-corda pode, ainda, ser hospedeiro de certos tipos de nematoides. No Brasil, diversas espécies patogênicas a essa cultura estão catalogadas, apresentando elevado grau de patogenicidade. Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, principalmente *M. incognita* e *M. javanica*, que possuem extensa disseminação em toda área de cultivo do feijão-de-corda, e as espécies *Pratylenchus brachyurus* e *Radopholus similis*, representantes dos gêneros *Pratylenchus* e *Radopholus*, respectivamente, merecem menção pela sua patogenicidade (Ponte, 1988).

Em alguns casos, infecções mistas, como por exemplo, aquelas provocadas por dupla infecção (vírus-vírus; vírus-bactéria etc.) têm sido relatadas, agravando, ainda mais, as perdas. É o caso da dupla infecção de BICMV (Tabela 1) e CMV (*Cucumber Mosaic Vírus*) ocasionando o “nanismo do caupi” (diminuição do tamanho de todos os órgãos vegetativos), mosaico intenso, distorção de folhas e necrose sistêmica.

Além de todas as pragas presentes nas áreas de cultivo, o feijão-de-corda (grão) 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*. As principais são: *Acanthoscelides clandestinus* (Mots.), *A. obtectus* (Say), *Zabrotes subfasciatus* (Boh.), *Callosobruchus analis* (Fabr.) e *C. maculatus* (Fabr.), essa última conhecida como gorgulho, sendo a principal praga do feijão-de-corda (grão) armazenado (Baker et al., 1989). *C. maculatus* pode reduzir o valor comercial dos grãos destinados à alimentação humana em até 50%, transmitindo-lhe sabor desagradável e mau aspecto comercial.

De um modo geral, o controle das ações dos organismos referidos acima se baseia, fundamentalmente, no emprego de sementes sadias e certificadas e na proteção das sementes, plântulas e plantas adultas com agrotóxicos que, além de onerosos para a agricultura, particularmente a de subsistência, e inacessíveis à grande maioria dos pequenos produtores, são danosos à saúde, sendo também poluentes do meio ambiente. Muitos produtores aplicam quantidades significativas desses agrotóxicos para controlar as pragas e patógenos do feijão-de-corda (Omongo et al., 1998), resultando em danos à saúde, bem como desvantagens econômicas e ecológicas.

1.3 Doenças ocasionadas por vírus ao feijão-de-corda

Os vírus de plantas são parasitas intracelulares obrigatórios, dependendo da célula viva para sua sobrevivência, isto é, são organismos biotróficos. Necessitam estar no interior da célula para sua replicação. Desprovidos de mecanismos próprios para romper a parede celular e entrar e sair da célula, eles dependem de vetores para infectar a célula vegetal. Os principais mecanismos de disseminação dos vírus são: insetos, sementes infectadas e inoculação mecânica (Zerbini Junior *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Alguns vírus que infectam o feijão-de-corda

Espécie Viral	Gênero	Família	Forma de transmissão	Referências
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Afídeos, sementes e inoculação mecânica	Lima et al., (2005); Eiras et al., (2004); Brioso (2009); Thottappilly e Rossel, (1985)
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Afídeos, sementes e inoculação mecânica	Lima et al., (2005); Brioso (2009); Thottappilly, Rossel, (1985)
<i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV)	<i>Comovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Besouros e inoculação mecânica	Lima et al., (2005); Brioso (2009); Thottappilly e Rossel, (1985)
<i>Cowpea golden mosaic virus</i> (CPGMV)	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	Enxertia, mosca branca	Lima et al., (2005); Brioso (2009); Thottappilly e Rossel, (1985)
<i>Cowpea mosaic virus</i> (CPMV)	<i>Comovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Besouro, sementes e inoculação mecânica	Thottappilly e Rossel, (1985)
<i>Cowpea rugose mosaic virus</i> (CPRMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Afídeos e inoculação mecânica	Thottappilly e Rossel, (1985); Brioso (2009)
<i>Cowpea green vein-banding virus</i> (CGVBV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Afídeos, sementes e inoculação mecânica	Thottappilly e Rossel, (1985); Brioso (2009)
<i>Cowpea chlorotic mottle</i> (CCMV)	<i>Bromovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Besouros e inoculação mecânica	Thottappilly e Rossel, (1985)
<i>Cowpea mottle virus</i> (CMeV)	<i>Não agrupado</i>	<i>Ptyviridae</i>	Besouro, sementes e inoculação mecânica	Thottappilly e Rossel, (1985)
<i>Cowpea mild mottle</i> (CMMV)	<i>Carlavirus</i>	<i>Flexiviridae</i>	Mosca branca, sementes e inoculação mecânica	Thottappilly e Rossel, (1985)

Fonte: Oliveira *et al.*, 2011.

O feijão-de-corda é infectado por mais de 20 espécies diferentes de vírus em diferentes regiões do mundo (Thottappilly; Rossel, 1985), dos quais alguns estão na tabela 2. Na Nigéria, foram relatados oito vírus infectando essa leguminosa (Thottappilly; Rossel, 1992).

Dentre os principais vírus que infectam o feijão-de-corda no Brasil estão os pertencentes à subfamília *Comovirinea* incluída na família *Comoviridae*, possuindo três gêneros: os *Comovirus*, *Favavirus* e *Nepovirus*. O gênero *Comovirus* se destaca dos demais gêneros por possuir um grupo de vírus amplamente estudado, além de algumas espécies desse gênero serem responsáveis por grandes perdas em culturas de interesse econômico e social, dentre elas a do feijão-de-corda. Na região Nordeste do Brasil, os principais vírus que infectam o feijão-de-corda são: *cucumber mosaic virus* (CMV), *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e o *cowpea golden mosaic virus* (CPGMV) (Lima *et al.* 2005).

A primeira ocorrência do CMV infectando feijão-de-corda, no Brasil, foi descrita em Goiânia, Goiás (Lin *et al.*, 1981a). No ano seguinte, também, foi detectado a ocorrência desse vírus no Piauí (Lin *et al.*, 1982). Apesar desse vírus não ser capaz de provocar reduções significativas na produção, possui maior gama de cultivares suscetíveis, sendo capaz de interagir sinergicamente com a maioria dos potyvírus.

Os mosaicos de potyvirus (CABMV e BICMV) comum na África (Marrocos, Zâmbia, etc.) e na Ásia (Japão, Filipinas, China, etc.) chegaram ao Brasil no início da década de 70. Dependendo da interação entre cultivar e estirpe, bem como da época de início da infecção, perdas elevadas (acima de 50%) têm sido relatadas em condições de campo e casa de vegetação (Pio-Ribeiro e Assis Filho, 1997).

No que diz respeito ao vírus do mosaico dourado do caupi (CPGMV) a situação também é preocupante. Inicialmente, a mosca *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) constituiu-se no único vetor nas regiões semi-áridas do Brasil. A infecção viral tornou-se mais acentuada com a introdução, na região, da *Bemisia agentifolii* (mosca-branca), que é capaz de se reproduzir e transmitir o vírus mais eficientemente, infestando a região Nordeste brasileira em poucos meses.

O vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV) encontra-se disseminado e apresenta difícil controle devido à grande variedade de hospedeiros (*Calopogonium mucunoides*, *Centrosema pubescens*, *Crotalaria juncea*) e à numerosa população de vetores, a maioria deles dos gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica* (Coleoptera, *Chrysomelidae*) Freire-Filho *et al.*, (1999). As perdas na produção de feijão-de-corda, em condições de campo, resultantes dessa virose podem chegar a 80%, dependendo da suscetibilidade das plantas e da época em que as plantas hospedeiras são infectadas (Rios, 1984). Sem controle, a doença frequentemente alcança dimensões epidêmicas.

1.4 Cowpea severe mosaic virus – CPSMV

O primeiro registro do CPSMV no Brasil aconteceu no Rio Grande do Sul por Oliveira (1947). Desde então, sua distribuição alcançou todas as regiões produtoras do feijão-de-corda Lima *et al.* (2005). É um vírus do gênero *Comovirus*, possui seu genoma dividido em dois RNAs (Figura1): RNA 1 ou RNA B (*bottom component*) e RNA 2 ou RNA M (*midlle component*). Cada RNA é encapsulado, separadamente, em cápsides icosaédricas, mas ambos têm funções de produzir proteínas de grande importância para o vírus, sendo o RNA 1 com função de produzir proteínas de replicação viral, enquanto o RNA 2 é responsável por produzir proteínas capsidiais, que é uma das diferenças marcantes entre esses dois RNAs.

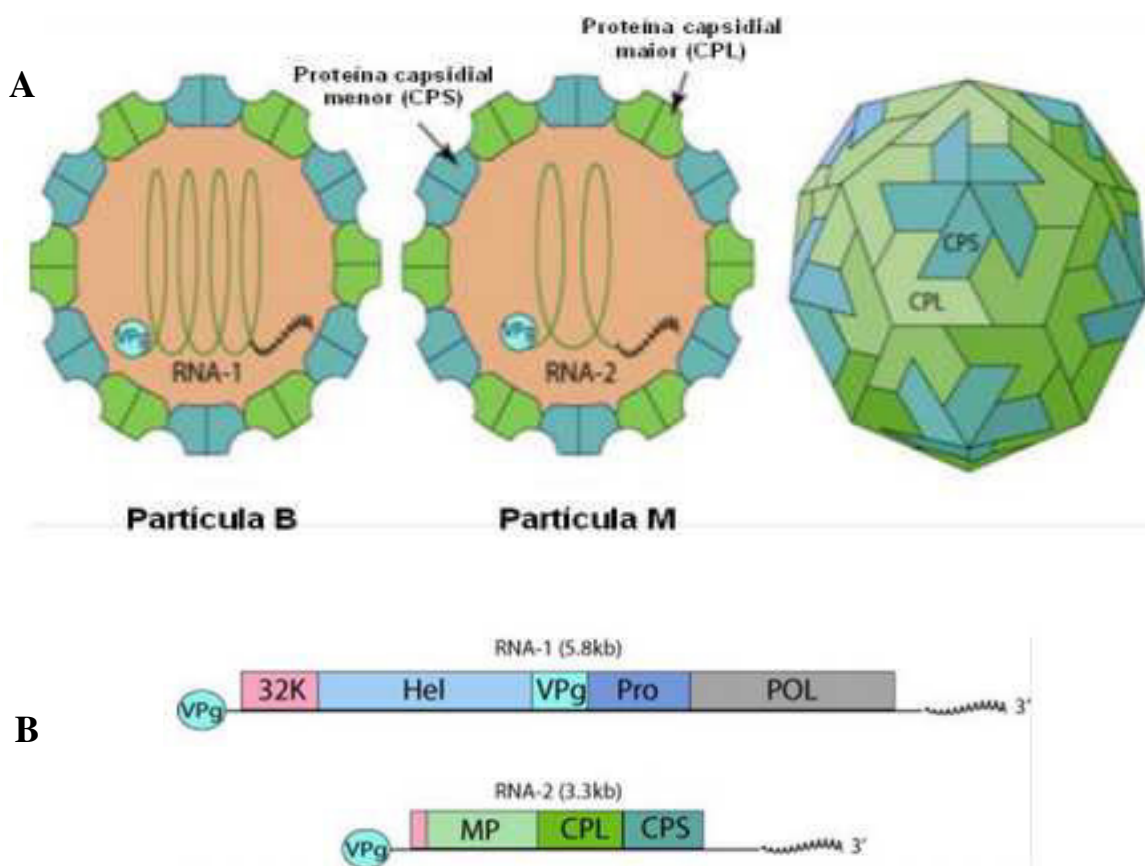


Figura 1 – Ilustração da estrutura genômica do CPSMV. (A) Mapa genômico bipartido comum aos vírus do gênero *Comovirus*. (B) Fitas de RNA 1 e RNA 2 do genoma de vírus do gênero *Comovirus*.

Fonte: Adaptado do ViralZone, 2012.

As espécies pertencentes ao gênero *Comovirus* infectam uma gama relativamente estreita de plantas, limitados, principalmente, à família *Fabacea* (Bradshaw *et al.*, 2011),

também conhecida como *Leguminosae*. Segundo Paz *et al.*, (1999), já foram detectadas a presença de CPSMV em 23 espécies dessa família de plantas. A transmissão desses vírus ocorre através de inoculação mecânica ou por vetores, como os insetos da ordem dos coleópteros (Barradas *et al.*, 1991). O CPSMV está associado aos coleópteros da família *Cryomelidae*, destacando-se as espécies *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa* (Costa *et al.*, 1978). O primeiro relato sobre *Cerotoma arcuata* como vetor de CPSMV data de 1963, no Suriname (Van Hoff, 1963). No Brasil, a primeira constatação de *Cerotoma arcuata* como vetor foi de Costa *et al.*, (1978).

Além do feijão-de-corda, existe uma diversidade de espécies de plantas hospedeiras nativas do CPSMV, como *Canavalia ensiformes*, *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema pubescens*, *Crotalaria juncea*, *Vigna unguiculata* subsp. *Sesquipedalis*, que são as principais plantas responsáveis pela perpetuação do vírus, atuando como fonte primária do inóculo, (Rios & Neves, 1989).

Atualmente, existem na região Nordeste do Brasil alguns isolados de CPSMV classificados com base em determinantes antigênicos específicos para distinção sorológica desse vírus: O CPSMV-CE foi o primeiro isolado a ser caracterizado, tendo sido obtido no Estado do Ceará (Lima & Nelson, 1973). Após isso, foi descoberto o CPSMV-MC, um isolado capaz de infectar um genótipo (Macaibo) de feijão-de-corda imune aos diversos isolados de CPSMV (Lima *et al.*, 1998). Em 2005 o CPSMV-CROT, foi obtido da planta *Crotalaria paulinea* L. no Estado do Maranhão (Lima *et al.*, 2005a).

O CPSMV, além de ocasionar infecções isoladas em plantas de feijão-de-corda, pode, também, causar infecções mistas com vírus de outros grupos, como por exemplo, com vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV); com o vírus do mosaico do caupi transmitido pelo pulgão (*Cowpea aphid – borne mosaic virus* - CABMV); ou com CMV e CABMV. As Infecções causadas por vírus, isoladas ou mistas, podem ter efeitos devastadores sobre o crescimento, produtividade e a qualidade nutricional da cultura. Esses efeitos dependem da idade da planta quando infectada, dentre outros fatores.

Dentre os sintomas observados por plantas doentes infectadas pelo CPSMV, são encontrados, frequentemente, subdesenvolvimento das nervuras principais, bolhosidades, e distorção foliar. As sementes produzidas nas plantas atacadas apresentam-se deformadas e manchadas, com acentuada perda do poder germinativo. Quando não controlada, a virose do CPSMV toma proporções epidêmicas (Kareem; Taiwo, 2007). As medidas de prevenção geralmente envolvem a aplicação semanal de inseticidas para controlar a população de vetores

e, conseqüentemente, a disseminação do vírus. Este método, além de dispendioso, é prejudicial ao meio ambiente e não-efetivo na estação chuvosa, quando as plantações estão em fase de crescimento (Umaharan *et al.*, 1996).

Por conta da ampla distribuição do vírus nas regiões de plantio e dos diferentes tipos de hospedeiros naturais existentes no Brasil, a identificação de fontes de resistência e sua incorporação a cultivares produtiva estão entre as maiores preocupações dos pesquisadores que trabalham com o feijão-de-corda (Freire-Filho *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2003).

1.5 Respostas de defesa de plantas contra patógenos

As plantas estão continuamente expostas ao ataque de patógenos, sendo assim desenvolveram durante o processo de evolução complexos mecanismos diferenciados de defesas que podem ser acionados geralmente por fungos, bactérias e vírus, gerando uma resposta apropriada e de forma adaptativa.

O sistema de defesa vegetal é multicomponente, atuando de maneira dinâmica, coordenada, no momento e local apropriados e com magnitude adequada. Essa complexidade funcional, espacial e temporal inicia-se com o reconhecimento, pelo hospedeiro, de sinais exógenos provenientes do patógeno, continua com os mecanismos de transdução desses sinais e resulta em extensa reprogramação do metabolismo celular vegetal, envolvendo mudanças na atividade gênica (Walters *et al.*, 2007).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, devendo estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração da(s) substância(s) impliquem em mudanças na expressão da doença (Schwan-Estrada *et al.*, 2008).

De maneira geral, os mecanismos de resistência podem ser (Pascholati & Leite, 1994):

A) Pré-formados (passivos ou constitutivos):

a) estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;

b) bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases.

B) Pós-formados (ativos ou induzíveis):

a) estruturais: papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP), camadas de cortiça, camadas de abscisão, tiloses;

b) bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies ativas de oxigênio.

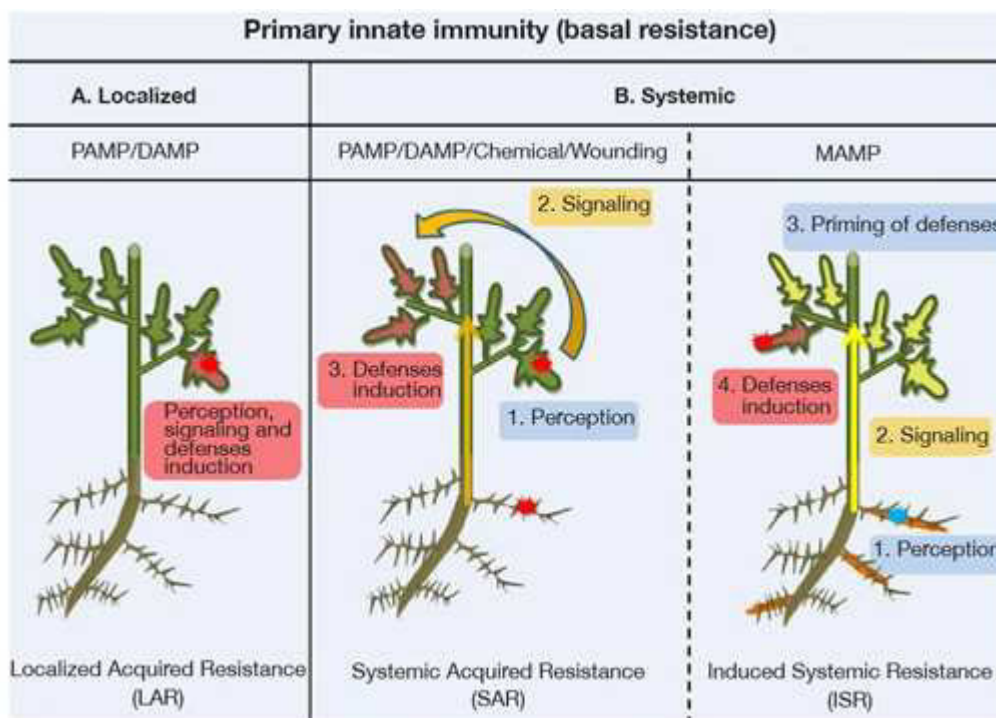


Figura 2 – Mecanismos de resistência vegetal. Resistência localizada (A) Resistência sistêmica (B)

Fonte: Guillaume *et al.*, 2011.

Os mecanismos de resistência podem originar quatro reações de defesas diferentes: resposta hipersensitiva (RH ou HR), resistência sistêmica adquirida (RSA ou SAR); resistência sistêmica induzida (ISR ou RSI) e resistência localizada adquirida (LAR). A resposta hipersensitiva (HR) constitui-se em uma morte celular programada, a qual ocorre no sítio de infecção, levando ao colapso do tecido vegetal, restringindo, assim, a colonização do patógeno. A resistência sistêmica adquirida (SAR) (Figura 2B) caracteriza-se pela indução da resistência em locais da planta distantes do local da infecção pelo patógeno e teria início no momento da interação planta - patógeno ou do tratamento com fatores abióticos, sendo salicilato dependente podendo envolver modificações nas paredes celulares vegetais, produção de proteínas-PR. A resistência sistêmica induzida (ISR) (Figura 2B) é um

mecanismo que induz a proteção da planta sistematicamente, mas não há acúmulo de proteínas-PR, não é salicilato dependente e seu agente indutor geralmente não é um patógeno. resistência localizada adquirida (LAR) (Figura 2A) é uma resistência local a nível de membrana plasmática desencadeada pela planta após o reconhecimento do patógeno (Silva *et al.*, 2008).

A presença de agentes infecciosos é detectada através do reconhecimento dos sinais microbianos. Todos os sinais que são percebidos pelas células vegetais e induzir respostas de defesa são considerados como elicitores (indutores), que podem ser específicos ou gerais.

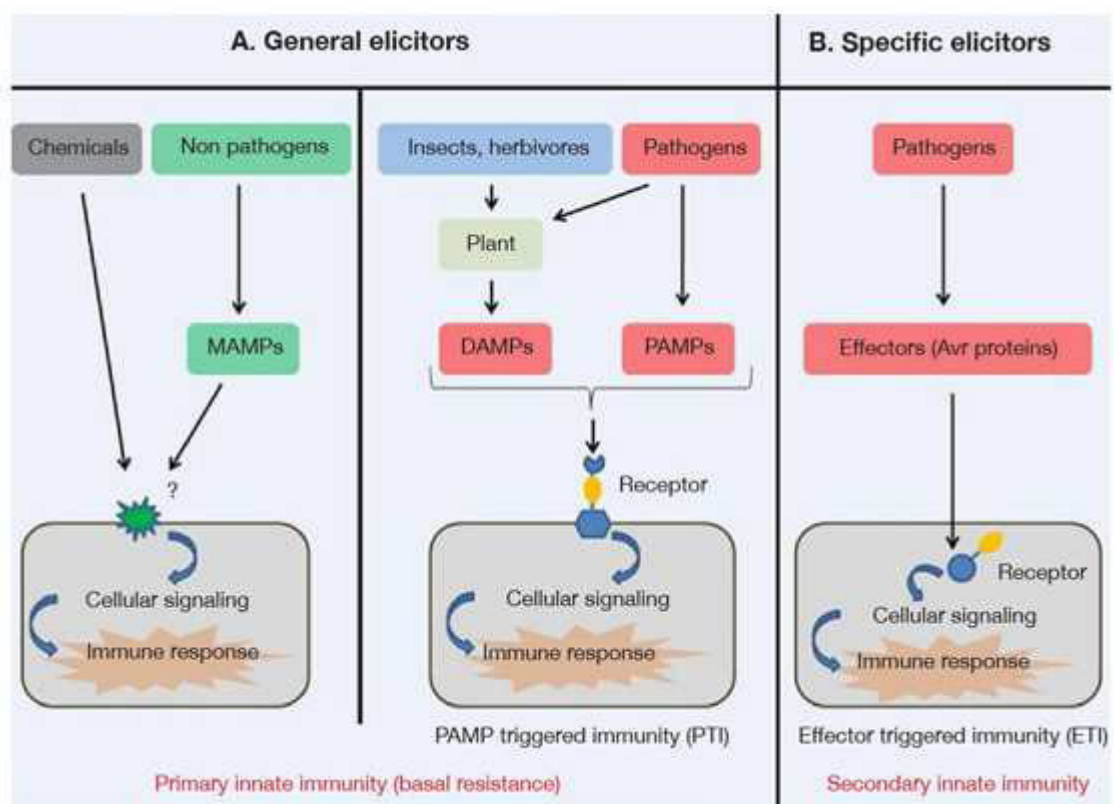


Figura 3 – Tipos de elicitores envolvidos na defesa vegetal. Elicitores gerais (A) Elicitores específicos (B)

Fonte: Guillaume *et al.*, 2011.

Elicitores gerais são designados como PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) quando isoladas a partir de agentes infecciosos, mas podem também corresponder à sinais endógenos derivados de plantas hospedeiras, resultando da ação do agente patogénico chamados DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), para sinais de microorganismos não patogénicos ou agentes químicos são referidos como MAMPs (Microbe-Associated

Molecular Patterns) (Figura 3A). A percepção de elicitores gerais desencadeia uma ampla variedade de reações, que culminam na ativação da chamada resistência basal ou PAMP-Triggered Immunity (PTI). As plantas desenvolveram também uma segunda linha de defesa por meio da resistência a doença específica (Figura 3B), genes (R), o assim chamado effector-triggered-immunity (ETI) (Pelletier *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006).

A reação da planta à infecção pode variar de acordo com o modo de colonização do patógeno, uma vez que microrganismos biotróficos agem buscando impedir o desencadeamento dos mecanismos de defesa da planta, enquanto que os necrotróficos agem suprimindo tais mecanismos.

Muitas plantas passam por mudanças bioquímicas significativas em resposta ao ataque de estressores bióticos, como patógenos ou insetos herbívoros. Ambos estressores bióticos quando atacam as plantas fazem com que estas respondam de forma rápida com uma “explosão oxidativa”, que constitui na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O acúmulo destas substâncias nas células vegetais pode ser tóxico para ambos. Estas EROs acionam moléculas para a indução de genes de defesa e a polimerização de proteínas que compõe a parede celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza. Existe uma variedade destas enzimas que irão decompor as espécies reativas de oxigênio. Como por exemplo, temos superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), entre outras (Nascimento & BARRIGOSI, 2014).

O acúmulo de fenóis também é conhecido como mecanismo de resistência de planta ao ataque de patógenos, envolvendo enzimas chaves como fenilalanina amônia liase (PAL), peroxidase (POX) e polifenol oxidase (PPO) participam da formação e oxidação de compostos fenólicos (War *et al.*, 2013).

1.6 Respostas do feijão-de-corda ao CPSMV

Cooper e Jones (1983) e Hull (2009) sugerem que as plantas ao serem atacadas pelos vírus podem ter como primeira linha de defesa a resposta imunitária, isto é, total ausência de infecções após sucessivas inoculações. Nesse caso, o vírus não se replica, mesmo sendo inoculado experimentalmente nos protoplastos. Por outro lado, se o vírus infecta e se replica na planta, esta é considerada como hospedeira. Neste caso, porém, a reação da planta ao vírus pode variar de altamente suscetível a altamente resistente. Essa resistência, por sua vez, pode

ser à infecção, à replicação ou à invasão sistêmica do vírus. Neste último caso, o vírus pode infectar e se multiplicar na planta, mas seu movimento a longa distância é impedido.

Thompson (1977), trabalhando com o isolado de CPSMV de Trinidad e Tobago, indicou que a imunidade é governada por um único gene de caráter recessivo. Watt *et al.* (1985) sugeriram que a imunidade a um isolado brasileiro de CPSMV é governada por dois genes. Outros estudos têm apontado para uma herança monogênica, porém genes diferentes (Assunção *et al.*, 2005), como é o caso de alguns cultivares, como o CNC 0434, desenvolvido por Jimenez *et al.*, (1989), e da linhagem L 254.008, desenvolvida por Coelho *et al.*, (1998), ambos possuindo um gene de imunidade ao CPSMV, no entanto diferentes.

Até agora, sabe-se que a imunidade de alguns genótipos de feijão-de-corda contra o CPSMV vem de genes de resistência recessivos. A resistência recessiva é um evento comumente encontrado em plantas.

Estudos recentes em vírus da família *Potiviridae* comprovaram que a imunidade de plantas a esses vírus envolve a incapacidade da proteína viral VPg de se ligar aos fatores eIF4E, eIF(iso)4E (Grzela *et al.*, 2006). Outro estudo recente, em nosso laboratório, envolvendo feijão-de-corda (genótipo Macaibo) e CPSMV associou a imunidade envolvendo os fatores de iniciação da tradução eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4G, eIF(iso)4G (Magalhães, 2011).

Apesar de haver estudos sobre a imunidade do feijão-de-corda contra CPSMV, faltam informações da interação feijão-de-corda e CPSMV, no que se refere aos mecanismos de resistência e suscetibilidade. Mecanismos de defesa no âmbito de respostas bioquímicas e moleculares ainda precisam ser elucidados. Ainda não se sabe, completamente, que genes, proteínas e mecanismos bioquímicos e fisiológicos estão envolvidos na defesa do feijão-de-corda ao CPSMV.

A resistência a doenças em plantas está associada com a ativação de uma ampla variedade de respostas de defesa que podem parar ou retardar a infecção em certas fases da interação planta-patógeno. Plantas evoluíram várias barreiras físicas e químicas pré-existentes, bem como respostas de defesa indutíveis que interferem no estabelecimento do agente patogênico (Jones & Dangl 2006; Zhao *et al.*, 2008; Vanitha *et al.*, 2009).

Segundo Zeeshan Siddique (2014), enzimas como, peroxidase de fenóis (POX), catalase (CAT), dismutase de superóxido (SOD), fenilalanina amônia liase (PAL), dentre outras, exercem papel ativo na resistência de genótipos de algodão quando infectados com o vírus da onda da folha do algodão, assim como o conteúdo de compostos fenólicos. Um

rápido e elevado nível de representação de enzimas de defesa são importantes indícios de resistência da planta ao patógeno (Vanitha & Umesha 2008).

Madhusudhan (2009), também observou o papel das enzimas peroxidase de fenóis (POX) e catalase (CAT), bem como do teor de peróxido de hidrogênio e ácido salicílico em plantas resistentes e suscetíveis ao *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) e ao *Tomato mosaic tobamovirus* (ToMV), associando também os resultados obtidos à resistência das plantas às infecções virais.

No entanto, são necessários estudos exaustivos para a compreensão dos mecanismos adaptativos e repostas de defesa à infecção causada pelo CPSMV ao feijão-de-corda que estão envolvidos na resistência e sobrevivência da planta. Além disso, há poucos e insuficientes relatos envolvendo as interações moleculares de resistência e suscetibilidade entre feijão-de-corda e CPSMV.

A busca por genótipos de feijão-de-corda imune à doença causada por CPSMV tem sido a medida mais apropriada para o controle do vírus. Fontes de resistência ao CPSMV no germoplasma do feijão-de-corda têm sido relatadas por diversos pesquisadores, que vai desde linhagens moderadas até imunes. Em face da escassez de conhecimentos básicos sobre os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos relacionados com a resistência de alguns genótipos de feijão-de-corda ao CPSMV, tornam-se imprescindíveis pesquisas que identifiquem não só as variedades de feijão-de-corda resistente ao ataque de seus inimigos naturais, que com elas co-habitam num mesmo ecossistema, mas, também, as bases moleculares e bioquímicas que conferem estas características à planta. O conhecimento gerado a partir dessas pesquisas poderá vir a subsidiar programas de melhoramento genético do feijão-de-corda, visando aumentar sua resistência a pragas e doenças e, conseqüentemente, melhorias na qualidade nutricional dos seus grãos.

2. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Enzimas relacionadas à defesa de planta contra patógenos (catalase, peroxidase do ascorbato, dismutase de superóxido, peroxidase de fenóis, polifenol oxidase e fenilalanina amônia liase) apresentam cinéticas distintas, além de conteúdos diferentes de ROS (superóxido e peróxido de hidrogênio) e compostos fenólicos em genótipos resistentes e suscetíveis de feijão-de-corda, quando infectados com vírus do mosaico severo do

caupi – CPSMV, proporcionando o acionamento de um complexo mecanismo de defesa dessas plantas diferenciando-as em fenótipos resistentes e suscetíveis ao CPSMV.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Encontrar possíveis associações entre os fenótipos de resistência e susceptibilidade de genótipos de feijão-de-corda ao CPSMV e diferenças na cinética de enzimas envolvidas com a geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), metabolismo de compostos secundários e com a patogênese.

3.2 Específicos:

Medir a cinética de atividades de enzimas relacionadas com ROS (dismutase de superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato), metabolismo de fenóis (fenilalanina amônia liase e polifenoloxidase) e com a patogênese em folhas secundárias e avaliar possíveis correlações com as características de resistência e susceptibilidade dos genótipos de feijão-de-corda, suscetíveis (BRS pujante e CE-31 [sinônimo pitiúba]) e resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) ao CPSMV.

Quantificar e comparar os teores de ROS (íon superóxido e peróxido de hidrogênio) e compostos fenólicos totais em folhas secundárias de feijão-de-corda, inoculado e não inoculado com o CPSMV, avaliando possíveis associações com as respostas de resistência e susceptibilidade dos genótipos BRS pujante e CE-31, e BRS rouxinol e BRS marataoã, respectivamente, ao CPSMV.

Correlacionar às atividades de catalases, peroxidases do ascorbato e dismutases de superóxido em folhas secundárias dos genótipos suscetíveis (BRS pujante, CE-31) e resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) ao CPSMV com a análise de seus respectivos transcritos.

CAPÍTULO I

CINÉTICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM GENÓTIPOS DE FEIJÃO-DE-CORDA RESISTENTES E SUSCETIVEIS, DESAFIADOS COM O CPSMV

1. INTRODUÇÃO

Radical livre se refere a qualquer átomo ou molécula capaz de existir independentemente e que possui um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell; Gutteridge, 2006). A terminologia espécies reativas de oxigênio (ROS) inclui os radicais livres e outras espécies que, embora não possuam elétron desemparelhado, são muito reativas devido a sua instabilidade (Ribeiro *et al.*, 2005). Dentre as principais formas de ROS de importância biológica incluem-se o íon superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são produzidas por reduções parciais do oxigênio.

A produção de ROS se dá em diferentes localizações em células de plantas. A principal fonte dessas moléculas são os cloroplastos, que produzem O_2^- nos fotossistemas I e II (Asada, 2006). Em mitocôndrias, ocorre produção de O_2^- nos complexos I e III (Møller, 2001), e os peroxissomos são responsáveis pela síntese de O_2^- e H_2O_2 através de várias reações metabólicas (Del Rio *et al.*, 2006).

Sob condições fisiológicas normais, a produção das ROS é controlada por componentes de defesa antioxidante (Apel; Hirt, 2004). Contudo, o equilíbrio entre a síntese e remoção dessas espécies reativas de oxigênio pode ser rompido devido ao acúmulo acelerado de ROS, queda na atividade antioxidante ou em ambas as situações, ocasionando a condição de estresse oxidativo. Diversos fatores ambientais, classificados em abióticos (alta irradiância, seca, hiperoxia, hipoxia, anodeficiência mineral, baixas e altas temperaturas) e bióticos (infecção bacteriana, fúngica ou viral) são capazes de produzir estresses oxidativos (Carrillo; Valle, 2005).

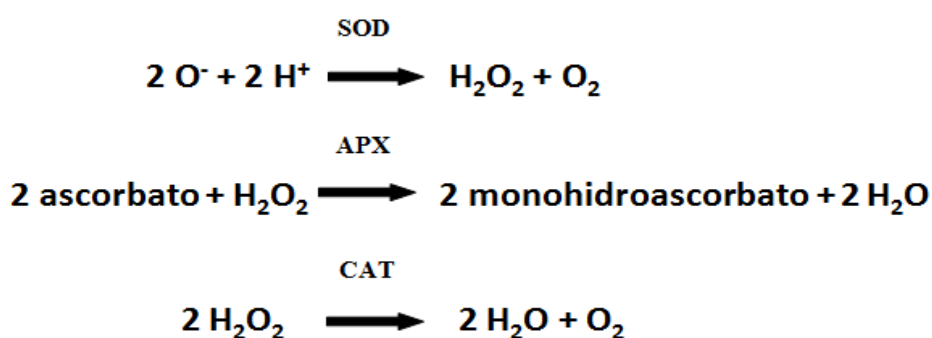


Figura 4: Reações catalisadas pelas dismutases de superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX) e catalases (CAT). Fonte: Resende, 2003.

Para evitar os danos causados pelas ROS, as plantas apresentam mecanismos de defesa, os quais incluem a síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos, como alfa-tocoferol e carotenóides, e enzimáticos como dismutases de superóxido (SOD), catalases (CAT) e peroxidases do ascorbato (APX), que têm suas reações representadas (Figura 4).

As principais vias de drenagem enzimática das ROS em plantas incluem SOD nos cloroplastos e em todos os compartimentos celulares; APX no ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos; e CAT nos peroxissomos (Chaudière; Ferrari-Iliou, 1999; Mittler, 2002).

No entanto, a vantagem de usar enzimas implica no fato de existir uma ampla variedade de mecanismos de regulação que permitem adaptações às necessidades celulares. Várias destas enzimas podem ser induzidas, inibidas ou ativadas por efetores endógenos (Gratão *et al.*, 2005).

A explosão oxidativa, caracterizada pela rápida geração e acúmulo de ROS, após a percepção dos elicitores (dos patógenos e/ou plantas) e/ou efetores (dos patógenos) pela planta, atua com diferentes funções de defesa, tanto diretas como indiretas. Por exemplo, de uma forma direta, o efeito tóxico do H₂O₂ ao patógeno, agindo como um agente antifúngico ou antibacteriano, e, de forma indireta, regulando a expressão de genes envolvidos com vários mecanismos de resistência, como indução de genes de defesa e morte celular, nessa condição o H₂O₂ age como um sinal para indução de genes de proteção celular nas células vizinhas, para restringir o desenvolvimento da lesão (HR), que é, então, acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência sistêmica adquirida (SAR). Assim, o estabelecimento de mecanismos de controle dos níveis destas espécies reativas de oxigênio contribuirá para o desenvolvimento da habilidade de um hospedeiro em ser capaz de resistir ou sucumbir ao ataque de um determinado agente patogênico (Fernandes, 2004).

Vários trabalhos correlacionam explosão oxidativa e seus sistemas enzimáticos de controle com a resistência da planta ao patógeno, como ocorre na infecção do tabaco pelo vírus *Potato virus Y^{NTN}*, que comprovam o envolvimento da atividade da CAT, da SOD e conteúdo de H₂O₂ com a suscetibilidade da planta a esse vírus (Petra Spoustová *et al.*, 2015). Em um trabalho com genótipos de algodoeiro resistentes a vírus, foram observados participação ativa de enzimas relacionadas com o estresse oxidativo (Zeeshan Siddique *et al.*, 2014).

Muitos dos estudos realizados com o patossistema feijão-de-corda e CPSMV abordaram a sintomatologia, prospecção de genótipos resistentes e que conduziram a

informações sobre essa resistência ser ligada a poucos genes específicos, particularmente em plantas imunes a esse vírus. Entretanto, conhecimentos sobre os mecanismos de defesa relacionados com a dinâmica do estresse oxidativo e suas consequências nessas plantas de feijão-de-corda quando desafiados com esse vírus são muito limitados. Assim, é necessária a busca de novas informações nesse contexto, envolvendo as enzimas SOD, CAT e APX, bem como o íon superóxido e o peróxido de hidrogênio, para um melhor entendimento dos mecanismos de resistência do feijão-de-corda ao CPSMV.

2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

2.1. Material biológico

Plantas de feijão-de-corda dos genótipos suscetíveis (BRS pujante, CE-31) e resistentes ao CPSMV (BRS rouxinol e BRS marataoã), Lima (2011), com 0, 6, 24, 48 e 72 horas após a inoculação CPSMV.

Isolado de CPSMV-CE coletado a partir de folhas infectadas, apresentando sintomas típicos de mosaico severo, do genótipo CE-31.

2.2. Cultivo

As sementes de feijão-de-corda, (cedidas pelo Laboratório de Sementes da UFC e pela Embrapa Meio-Norte Piauí) foram selecionadas e tratadas com hipoclorito de sódio (0,05% de cloro ativo) por 3 minutos, em seguida, submetidas a 5 ciclos de lavagem com água destilada com duração de 2 minutos cada. Após esse procedimento, as sementes foram embebidas em água destilada por 20 minutos, à temperatura ambiente (23 ± 2 °C), para quebrar a dormência. A germinação das sementes foi feita em papel de filtro tipo *Germitest*[®] (28 x 38 cm) previamente autoclavado (121 °C, 1.5×10^5 Pa, 30 min) e encharcado com água grau Milli-Q estéril, sendo dispostos em forma de rolos e colocados em vasos mantidos próximos a 100% de umidade para ocorrer a germinação, em ausência de luz, por 2 dias. Em seguida, 5 sementes germinadas foram transferidas para vasos com medidas de 12 cm de altura por 12 cm de diâmetro, sendo areia de rio previamente lavada, exaustivamente com água de torneira, e, após, autoclavada (121 °C, 9.8×10^4 Pa, 30 minutos) usada como substrato.

Os vasos foram mantidos em casa de vegetação com radiação (photosynthetic photon flux density, PPF) variando de 300-650 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (190SA quantum sensor, LI-COR, USA), fotoperíodo de cerca de 12h e temperaturas de 27.0 ± 0.8 °C (noite) e 31.0 ± 3.0 °C (dia) com $79.8 \pm 10.9\%$ de umidade relativa..

As plantas foram regadas, diariamente, na mesma hora, com água destilada (aproximadamente, 120 mL por vaso) até o sexto dia. Posteriormente, elas foram regadas com a solução nutritiva descrita por Hoangland e Arnon (1950), mas modificada por Silveira *et al.* (2001), sendo constituída de cloreto de amônio 1M, nitrato de cálcio 1 M, sulfato de magnésio 1 M, Ferro EDTA 0,1 M, cloreto de potássio 1 M, fosfato de potássio dibásico 1 M, solução de micronutrientes e nitrato de potássio 1 M. A solução nutritiva foi diluída na proporção 1: 10 (v/v).

2.3. Inoculação do CPSMV

O extrato foliar para inoculação foi obtido através da maceração de folhas coletadas do genótipo suscetível CE-31, infectado com CPSMV em casa de vegetação do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa-LPVD, com tampão fosfato de potássio 0,01 M, pH 7, contendo sulfato de sódio 0,01% na proporção 1:10 (m/v) e carborundum (500-600 mesh) (1:10, m/v) usado como abrasivo para injuriar a folha, permitindo a infecção pelo vírus (Paz et al. 1999).

A inoculação com a suspensão (inóculo) preparada acima foi realizada 15 dias após o plantio em folhas secundárias. O tratamento controle foi feito apenas com tampão fosfato de potássio 0,01 M (pH 7,0), contendo sulfato de sódio 0,1% e abrasivo carborundum sem vírus.

As folhas secundárias de feijão-de-corda (genótipos: BRS pujante, CE-31, BRS rouxinol e BRS marataoã.) foram coletadas 0, 6, 24, 48 e 72 h após tratamento, transferidas para nitrogênio líquido no momento da coleta e armazenadas a -80 °C, para análises posteriores. O experimento ocorreu em três repetições.

2.4. Obtenção do extrato enzimático

As folhas secundárias coletadas nos diferentes tempos após os tratamentos foram maceradas durante 10 minutos sob banho de gelo, na presença de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo NaCl 0,15 M, PEG 3% (v/v), PMSF 1 mM, EDTA 2 mM e PVPP 1% (m/v), na proporção 1:4 (m/v). Após maceração, o homogeneizado foi centrifugado

(13000 x g, 4 °C, 20 min), o sobrenadante coletado e dialisado exaustivamente contra tampão de extração durante 48 horas, a 4 °C, com um volume do tampão correspondendo a 20 vezes o volume do extrato, sendo 4 trocas do tampão feitas nesse período.

2.5. Dosagem de proteínas solúveis totais

A dosagem de proteínas solúveis totais foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976). A uma alíquota de 0,1 mL do extrato dialisado 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi agitada em vórtex e deixada em repouso por 10 minutos. Após repouso, leituras de absorvância foram feitas a 595 nm, em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Através de uma curva pré-estabelecida com valores de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), a quantidade de proteína solúvel na amostra foi determinada. Os valores foram obtidos em triplicata e expressos em miligramas de proteína por mililitro (mgP/ml).

2.6. Determinação da atividade de Catalase (CAT)

A metodologia empregada para mensurar a atividade da CAT foi descrita por Havir e McHale (1987) e Peixoto *et al.* (1999). Em uma alíquota de 0,8mL da solução tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 7,0) 0,1 mL do extrato dialisado foi adicionado, sendo essa mistura reacional deixada em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos. Após, 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 112,5 mM foi adicionado à mistura reacional e a atividade da enzima foi medida a 240 nm com base no decréscimo da absorvância em intervalos de 20 segundos até atingir 2 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorvância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

2.7. Determinação da atividade de Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade de APX foi determinada seguindo a metodologia descrita por Koshiba (1993) e modificada por Peixoto *et al* (1999). Inicialmente, 0,1 mL de extrato dialisado foi adicionado a 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo ascorbato 0,5 mM, e essa mistura deixada em banho-maria a 30 °C por 10 minutos. A atividade de APX foi iniciada após a adição de H₂O₂ 2 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm,

em intervalos de 20 segundos, até atingir 2 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

2.8. Determinação da atividade de Dismutase de superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi realizada empregando a metodologia utilizada por Piacham *et al.*(2003). O ensaio consistiu na inibição da redução do substrato azul de nitrotetrazólio NBT, exercida pela enzima. Alíquotas de 0,05 mL de extrato dialisado foram adicionadas em placas de micropoços com uma mistura constituída de 0,01 mL de tampão fosfato de sódio 1 M (pH 7,8), 0,01 mL de Triton X-100 0,25% (v/v), 0,02 mL de L-metionina 130 mM, 0,02 mL de EDTA 1 mM, 0,02 mL de NBT 75 mM, 0,02 mL de riboflavina 10 mM e água grau Mili-Q para completar o volume de 0,2 mL de mistura reacional. A etapa de adição de NBT, riboflavina e de L-metionina foi feita na ausência de luz para evitar o início da reação. A reação foi conduzida em câmara com luz fluorescente de 40 W, e depois lida em leitora de ELISA em intervalos de 1 minuto, até completar 5 minutos. No branco do ensaio tampão de extração foi utilizado em lugar do extrato dialisado. A unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de amostra necessária para inibir 50% da fotorredução de NBT à formazana azul (Beauchamp e Fridovich, 1971), sendo expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

2.9. Determinação do teor de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi extraído e quantificado, conforme a metodologia de Gay *et al.*, (1999). Para extração do peróxido de hidrogênio folhas secundárias de feijão-de-corda, inoculado e não inoculado com CPSMV foram macerados na presença de tampão bórax-borato 50 mM (pH 8,4) na proporção 1:5 (m/v). O homogeneizado foi centrifugado (12.000 x g, 4 °C, 20 min) e o sobrenadante coletado. No ensaio, 0,2 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL da solução alaranjado de xilenol e essa mistura incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz, sendo a absorbância medida a 560 nm. A solução de alaranjado de xilenol foi obtida através da adição de 0,1 mL de **solução A** com 10 mL da **solução B**. A **solução A** era constituída de sulfato de ferro 25 mM, sulfato de amônio 25 mM, ácido sulfúrico 2,5 M em água grau Milli-Q q.s.p. 10 mL. A **solução B** era composta de

alaranjado de xilenol 125 μ M, sorbitol 100 mM em água grau Milli-Q q.s.p. 100 mL. Para o cálculo da concentração de peróxido de hidrogênio uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (0,5 nmol – 4 nmol) foi construída. O teor de peróxido de hidrogênio foi expresso em nmol de H₂O₂ por g de massa fresca (nmol H₂O₂/gMF)

2.10. Determinação histoquímica de superóxido

Na detecção de radicais superóxido a metodologia segundo Wohlgemuthet *et al.* (2002) foi utilizada, mas com modificações. Folhas secundárias de feijão-de-corda infectadas e não infectadas com CPSMV foram imersas em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) contendo 0,1% de NBT e azida 10 mM. Em seguida, foram incubadas durante 2 horas no escuro e, depois colocadas em solução de etanol: clorofórmio (3:1, v/v) contendo 0,15% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) para remover a clorofila. O superóxido foi visualizado pela formação de depósitos de formazana roxa no tecido foliar.

2.11. Determinação do teor de superóxido

A quantidade *in situ* de superóxido produzido foi determinada segundo o método descrito por Elster e Heuper (1976) adaptado por Jiang ziang (2001) pelo monitoramento da formação do nitrito a partir da reação de hidroxilamina na presença de superóxido. Para tanto, 0,2g de tecido foliar fresco foi macerado em 2 mL de tampão fosfato de potássio 65mM (pH 7,8), e a suspensão centrifugada (13.000 x g, 4°, 10 minutos) sendo o sobrenadante coletado. Em seguida, alíquotas de 0,3 mL do sobrenadante foram colocadas em contato com 1,6 mL de tampão fosfato de potássio 65 mM (pH 7,8), 0,1 mL de hidroxilamina e incubadas a 25 °C por 40 minutos. Após isso, 1 mL de sulfanilamida 1% (m/v) em ácido clorídrico (2,4 N), 1 mL de água grau Mili Q, e 1 mL de dicloridrato de N-(1-naftil etilenodiamina) 0,02% (m/v) em água foram adicionados. A mistura reacional foi homogeneizada em vórtex e incubada a 25 °C por 10 minutos, depois centrifugada (8 rpm, 5 min) e analisada em espectrofotômetro a 540 nm.

2.12. Delineamento estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição correspondente a três plantas. As médias obtidas de plantas infectadas com o

CPSMV foram comparadas com plantas não infectadas (controle) ao longo do tempo após infecção. A análise dos dados foi feita através do teste de variância simples (ANOVA), teste de Tukey e teste t de Student, com nível de significância de 5% (software: ASSISTAT, versão 7.7 beta).

2.13. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com utilização de kit de extração e purificação de RNA (Macherey-Nagel). Para a obtenção do RNA foi macerado tecido foliar com auxílio de nitrogênio líquido até formação de um pó fino (100mg). Em seguida, o pó resultante da maceração foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e adicionado 350 µL de RAP e 3,5 µL de β-mercaptoetanol, para lise celular, agitando-se em vórtex, posteriormente. O homogeneizado foi transferido para um filtro acoplado a um tubo coletor e centrifugado (Eppendorf centrifuge 5417) a 11.000 x g, 1 minuto para filtração do lisado. Após isso, 350 µL de etanol 70% (v/v) foram adicionados ao filtrado e este transferido para um novo filtro acoplado a um tubo coletor, sendo centrifugado a 11.000 x g, 30 s.. Após centrifugação, o filtro do tubo coletor foi transferido para um novo tubo coletor e 350 µL de MDB adicionados para dessalinização da membrana do filtro, sendo feita nova centrifugação (11.000 x g, 1 min.). Em seguida, 95 µL de rDNase foram adicionados à membrana do filtro e este deixado em repouso por 15 minutos, para digestão de DNA. Após isso, a amostra passou por um ciclo de 3 lavagens: a primeira com 200 µL de RAW2, a segunda com 600 µL de RA3 e a terceira com 250 µL de RA3 (após a primeira e segunda lavagem ocorreu centrifugação a 11.000 x g por 30 segundos e após a terceira lavagem ocorreu centrifugação a 11.000 x g por 2 minutos. Por fim, 40 µL de água livre de RNase foram adicionados ao filtro e este centrifugado (11.000 x g, 1 minuto), para eluição do RNA. O RNA total foi quantificado em aparelho NanoDrop 2000c (Thermo scientific), sendo utilizados 2 µL da amostra. Após quantificação o material foi estocado à -20 °C.

2.14. Integridade do RNA total

A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose. No preparo do gel, 50 mL de tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico 0,4 M, acetato de sódio 0,1 M e EDTA 10mM, pH 7], contendo 1,2% (m/v) de agarose foram utilizados. O gel

foi deixado em repouso por 25 minutos em um sistema de eletroforese, para polimerização. Em cada poço do gel, 1 μL do tampão Gotaq e um volume de amostra contendo 500 ng do RNA total foram colocados, sendo o volume final de 5 μL completado com água estéril livre de RNase. Para a corrida eletroforética o gel foi imerso em tampão igual ao do preparo do gel. A corrida foi realizada em corrente elétrica constante de 130 mA por cerca de 30 minutos. Após corrida, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 30 minutos. As bandas de RNA foram visualizadas por exposição do gel à luz UV (MiniBISpro).

2.15. RT-PCR

A reação da transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), foi conduzida, inicialmente, com volume reacional de 11,6 μL : 1 μL de oligo(dT) (Promega®), um volume de solução contendo 1000 ng de RNA e o volume final reacional completado com água estéril livre de RNase. A mistura reacional foi incubada em um termocilador (PTC 200 - MJ Research USA) a 70 °C por 5 minutos e, em seguida, a 4 °C por 5 minutos. Após isso, 4 μL do tampão da enzima Improm II, 1 μL de dNTP 1 mM, 2,4 μL de MgCl_2 25 mM e 1 μL da enzima Improm II (1 unidade/ μL), foram adicionados formando um volume final de 20 μL . Essa mistura foi feita a 4 °C, e a mesma colocada de volta ao termociclador programado com as seguintes temperaturas e tempos: 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos, sendo mantido a 4 °C até a retirada das amostras. Após a RT-PCR, as amostras foram estocadas à temperatura de -20 °C.

2.16. RT-PCR semiquantitativa

A funcionalidade do cDNA (realizada com iniciador para o gene da proteína *PhaFbox*), obtido a partir da RT-PCR, e a detecção do CPSMV (realizada com o iniciador para gene da proteína da capa viral, *cpsmv1*) nas amostras foram avaliadas usando a reação de RT-PCR semiquantitativa. Para a realização da PCR, 1 μL de amostra foi adicionado a 9 μL de uma mistura composta de 1 μL do iniciador na direção 5'-3' (*forward primer*), 1 μL do iniciador na direção 3'-5' (*reverse primer*), 6 μM do gene que foi amplificado, 0,1 μL de dNTP, 0,1 μL da enzima Gotaq polimerase (1 unidade/ μL), 2 μL de tampão da enzima polimerase Gotaq e 4,8 μL de água livre de RNase. A mistura reacional foi colocada em termociclador programado (3 minutos a 94 °C, 40 ciclos (desnaturação a 94 °C por 15

segundos, temperatura de anelamento 57,5 °C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 15 segundos). A amplificação do gene foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose, preparado com tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8), sendo as outras etapas de preparação do gel semelhantes ao do preparo do gel para verificação da integridade de RNA. Para a corrida eletroforética, 5 µL dos produtos da PCR foram colocados em cada poço do gel. As condições de corrida foram as mesmas para verificação da integridade de RNA. A amplificação do gene foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

2.17 RT-qPCR

Para os experimentos de RT-qPCR, os genes alvos *CAT 1*, *APX 1* e *CuZnSOD 1* foram selecionados para análise. Os genes *PhaFbox*, *PP2A*, *L23A1* e *L23A3* foram usados como normalizadores para os quatro genótipos de feijão-de-corda: BRS pujante, CE-31, BRS rouxinol e BRS marataoã. A análise de expressão gênica foi conduzida usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os cálculos de normalização dos níveis de expressão relativa foram feitos usando o software qbase^{PLUS} versão 1.5 (Biogazelle) (Hellemans *et al.*, 2007). Os dados foram validados usando o programa genorm^{PLUS} modulo em qbase^{PLUS} (Vandesompele *et al.*, 2002).

Os cDNAs utilizados foram diluídos 20 vezes em água livre de RNase. A análise dos genes selecionados foi realizada no equipamento Eppendorf Real-Time PCR System utilizando-se parâmetros de amplificação recomendados pelo fabricante (3 minutos a 94 °C, 40 ciclos (desnaturação a 94 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento conforme características dos iniciadores (Tabela 3) por 15 segundos e extensão a 72 °C por 15 segundos), seguido por uma curva de dissociação - ou de temperaturas ótimas de fusão (*melting*) de 60 a 94 °C, com incrementos de 4 °C. As reações foram realizadas em um volume final de 10 µL, sendo que a quantificação dos produtos de amplificação foi feita com base na incorporação do marcador fluorescente *GoTaq master mix SYBR Green* na dupla fita de cDNA, para cada reação de amplificação.

Tabela 3: Iniciadores (*primers*) usados para anelamento com genes alvos e genes de referência, tamanho do amplicon, número de acesso e temperaturas ótimas de fusão (*melting*) usadas para experimentos de avaliação da expressão gênica e normalização de resultados de expressão desses genes, em plantas de feijão-de-corda, inoculadas com o vírus do mosaico severo do cowpea (CPSMV) e plantas controles, não inoculadas

Gene	Produto gênico	Sequências do iniciador (5'→ 3')	Tamanho do fragmento amplificado (Amplicon) (pb)	Numero de acesso	Temperatura ótima de fusão (T _m , °C)
GENES ALVOS					
<i>CuZnSOD1</i>	Dismutase de superóxido dependente de CuZn	Fwd GGTGCCCTGAGATCACATT Rev ACCATTTCCTGACTG	102	HQ259253.1	57,5
<i>APXI</i>	Peroxidase do ascorbate I	Fwd CTACGCAGATTCTACCAGT Rev CATAGCCTTGCCGAACAC	172	GH621238.1	59.8
<i>CATI</i>	Catalase I	Fwd CCT GAA ACC CAA TCC CAA GTC Rev CCA TCC ATG TGC CTG TAA TCC	141	FJ392008	57,6
GENES NORMALIZADORES					
<i>Pha-F-Box</i>	Proteína F-Box	Fwd GCTTATTCAATCCGCTTGTC Rev GTCCTATAACAGCTTCTCCA	148	FG812521.1	57.5
<i>PPL2A</i>	Fosfolipase A2	Fwd GTCGCTGTGTAGGATTGGAG Rev AAGAAGAACTCGTGCTGTG	130	XM_0146581159.1	57.5
<i>L23A1</i>	Proteína ribossomal L23	Fwd GCTGTTCAACCCTAAACCCT Rev AGTAGGAGCCATATCAATCACTCA	103	XM_014641092.1	57.5
<i>L23A3</i>	Proteína ribossomal L23	Fwd AGAAGAAGATCAAGGACGCA Rev CAGGGCATCATAGTCAGGT	125	XM_007150221.1	57.5

3. RESULTADOS

3.1. Análise das atividades enzimáticas

Em interações plantas-patógenos, sinais moleculares ativam genes nucleares envolvidos nas respostas de defesa das plantas, culminando com o aumentando da atividade de enzimas associadas, direta ou indiretamente, ao estresse vegetal.

A presente investigação foi conduzida para avaliar as atividades das enzimas peroxidase de fenóis (POX), polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônia liase (PAL), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e dismutase de superóxido (SOD), além de quantificar alguns compostos, substratos ou produtos dessas enzimas, tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), compostos fenólicos e superóxido (O_2^-), e, ainda, a expressão gênica associada à SOD, CAT e APX.

Essas análises foram realizadas em folhas secundárias de dois genótipos resistentes (BRS rouxinol e BRS Marataoã) e dois genótipos suscetíveis (CE-31 e BRS pujante) de feijão-de-corda, inoculados e não inoculados com CPSMV, sendo as coletas das folhas definidas com base na sintomatologia decorrente da interação com o CPSMV.

Em testes preliminares, foi verificado o aparecimento de manchas cloróticas 72 HAI com o CPSMV (Figura 5). A presença do CPSMV nas plantas após inoculação foi comprovada 6 e 72 HAI por RT-PCR semiquantitativa, usando o gene *cpsmv1* da capa viral (Figura 6). Diante desses resultados, as coletas das folhas secundárias foram definidas para ocorrerem 0, 6, 24, 48 e 72 HAI com o CPSMV, para melhor avaliação da cinética de alterações bioquímicas ocorridas, ou não, nas plantas.

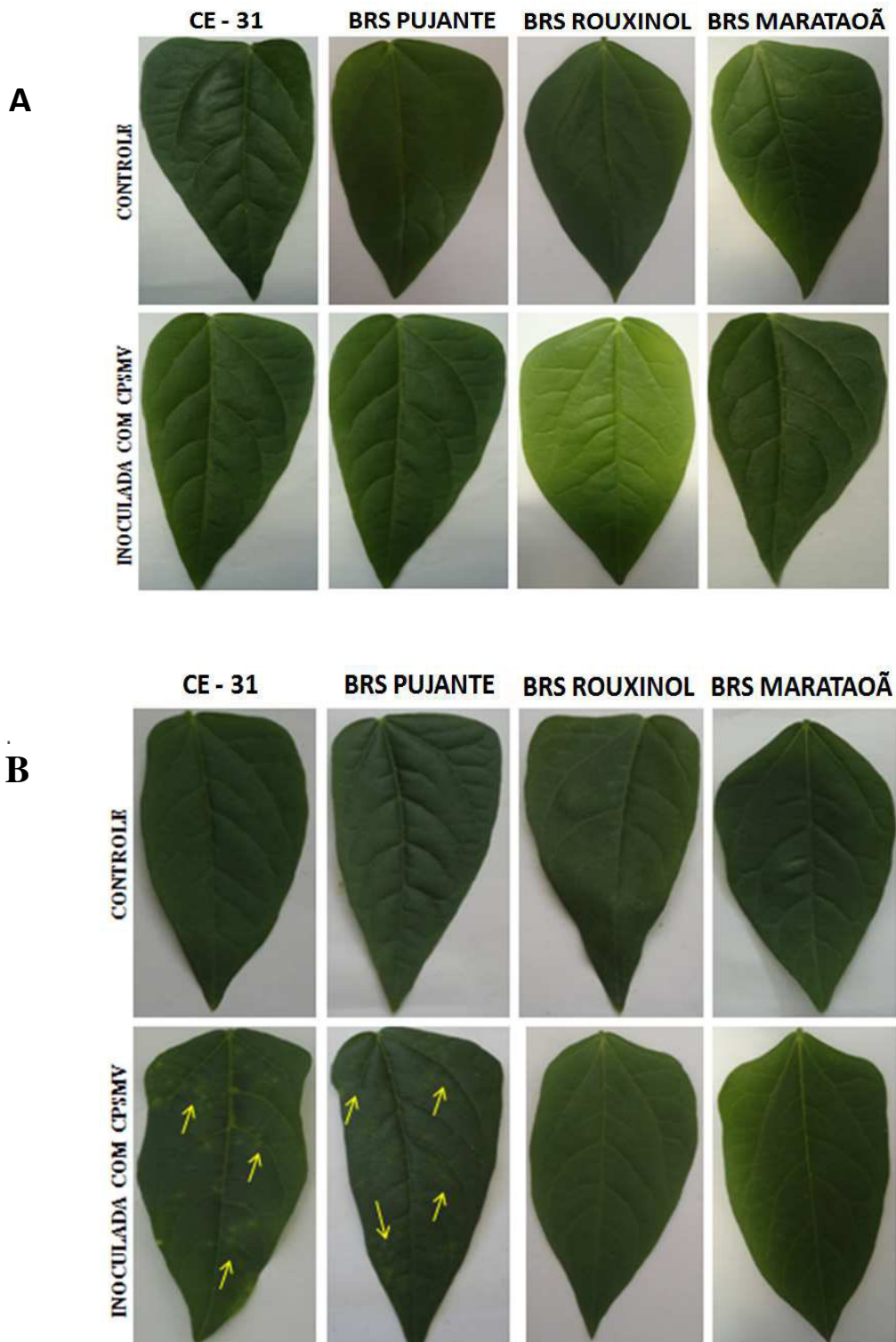


Figura 5. Folhas secundárias de feijão-de-corda coletadas 48 h (A) e 72 h (B) após inoculação (HAI) com CPSMV. Genótipos suscetíveis ao CPSMV: CE-31 e BRS pujante. Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol e BRS marataoã. As folhas controles foram injuriadas com carborundum, simulando o que foi feito para inoculação do vírus. Setas amarelas indicam manchas cloróticas.

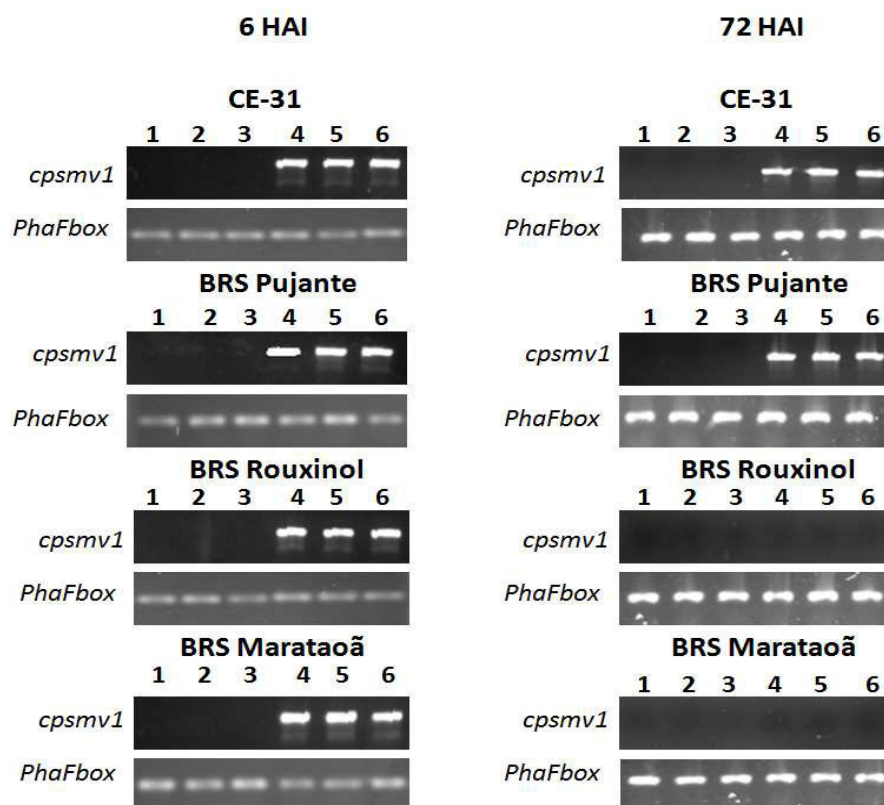


Figura 6. Presença do CPSMV em folhas secundárias de feijão-de-corda, coletadas 6 e 72 horas após inoculação (HAI) com o vírus, detectada por RT-PCR semiquantitativa usando o gene *cpsmv1* da capa viral. Genótipos suscetíveis ao CPSMV: CE-31 e BRS pujante. Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol e BRS marataoã. Plantas controles, não inoculadas (raias 1-3); plantas inoculadas (raias 4-6).

3.2. Íon superóxido: análise quantitativa e qualitativa

Quando inoculados com o CPSMV, os genótipos suscetíveis (BRS pujante e CE-31) não apresentaram diferenças significativas no teor do íon superóxido (O_2^-) comparados com seus respectivos controles não inoculados com o vírus (Figura 7A e 7B). O genótipo resistente BRS rouxinol apresentou conteúdo de O_2^- 53,4% superior nas plantas inoculadas com o CPSMV, em 0 HAI, mas teor 16,4% menor, 6 HAI, em relação às plantas controles (Figura 7C). O conteúdo de O_2^- para o genótipo resistente BRS marataoã foi 39,2% mais elevado nas plantas inoculadas, em 0 HAI, comparando com as plantas controles (Figura 7D). Nos demais tempos analisados, não foram encontradas diferenças significativas nos teores de O_2^- entre plantas inoculadas com o CPSMV e não inoculadas.

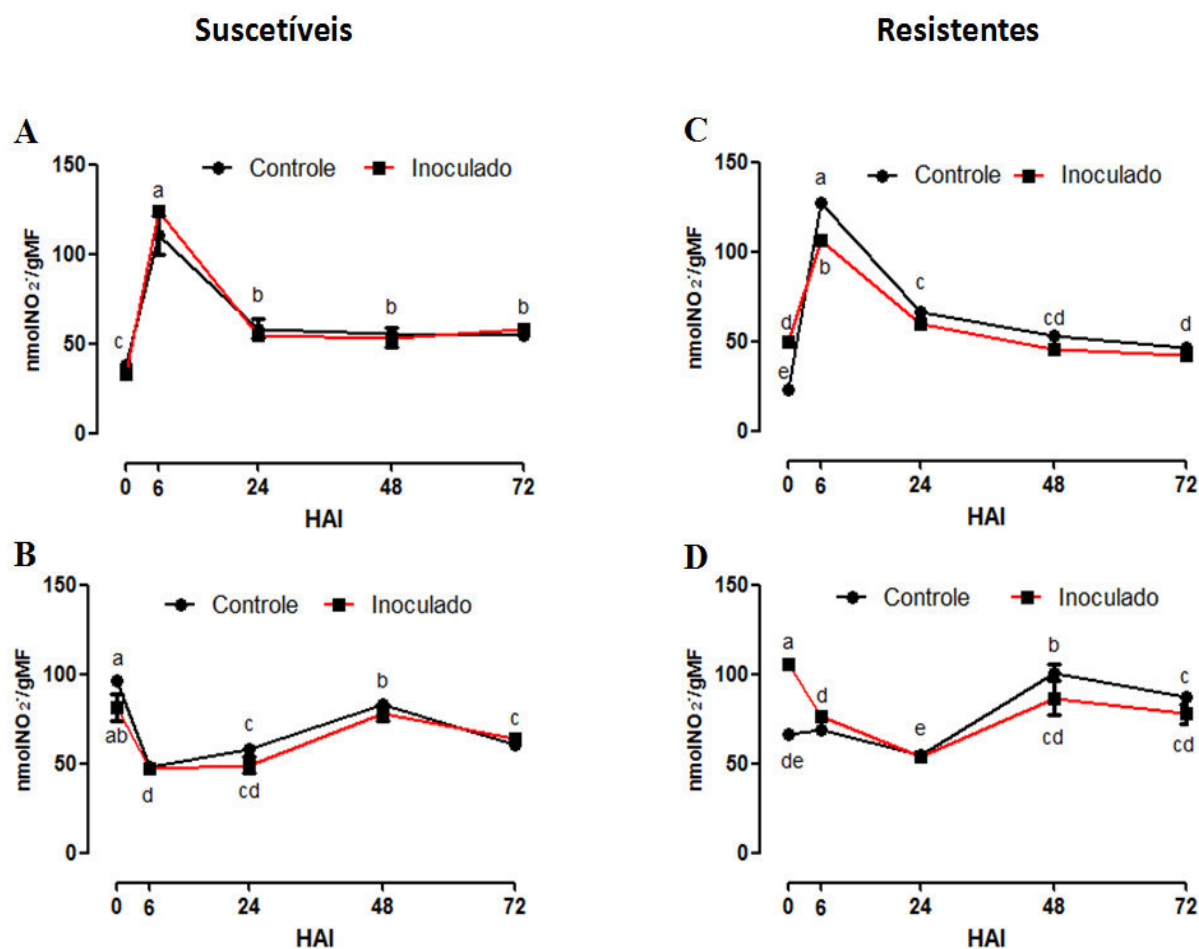


Figura 7. Conteúdo do íon superóxido (O_2^-) em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis ao CPSMV: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Diferentes letras indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$).

A presença de O_2^- nas folhas é denunciada pela presença de coloração roxa resultante de depósitos de formazan, que é o produto da reação do íon superóxido com azul de nitrotetrazólio (NBT). Em 0 HAI, as folhas dos genótipos resistentes, BRS rouxinol e BRS marataoã, ambos inoculados com o CPSMV, mostraram a presença desses pigmentos roxos em maior intensidade comparadas com seus respectivos controles (Figuras 8 C, G, D, H), enquanto não foi percebida grandes diferenças de coloração entre as folhas infectadas dos genótipos suscetíveis, CE-31 e BRS pujante, em relação aos seus respectivos controles (Figuras 8A, E, B, F). Esses resultados qualitativos concordam com os resultados obtidos com os ensaios quantitativos, que mostraram maior teor de O_2^- para os genótipos resistente inoculados com o CPSMV, em 0 HAI, em comparação com os respectivos controles.

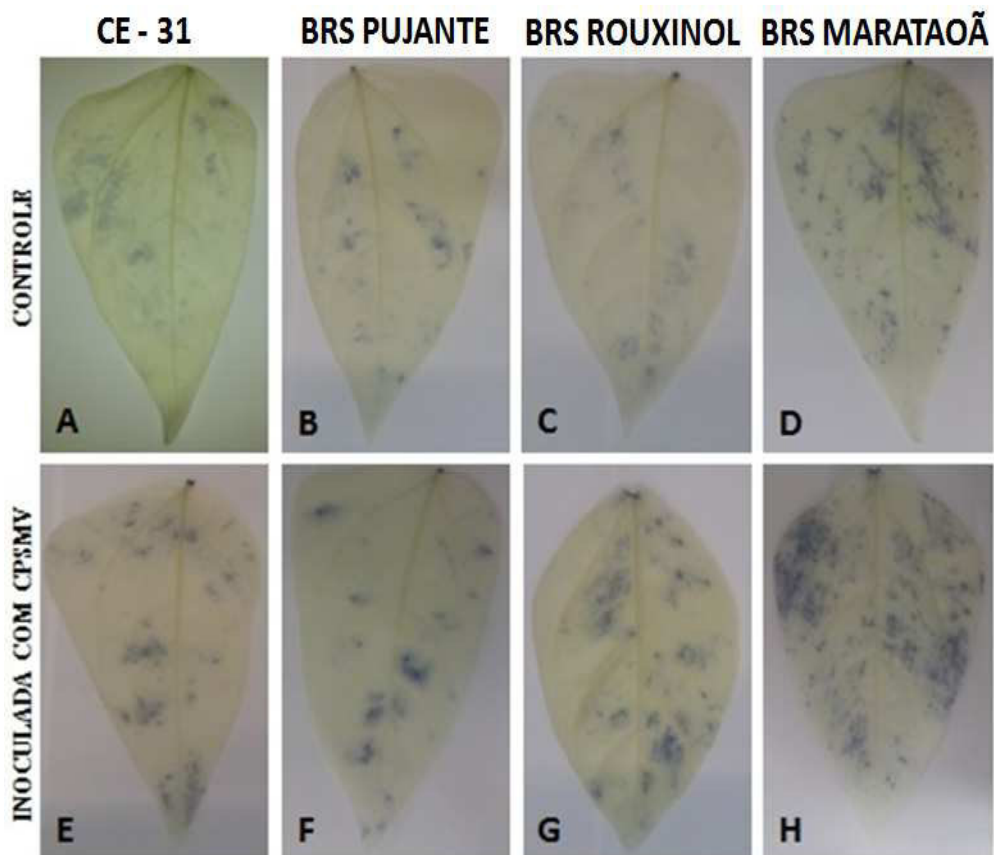


Figura 8. Folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV, mostrando a presença do íon superóxido (zonas azuis), em 0 HAI. Genótipos suscetíveis: CE-31 (A e E) e BRS pujante (B e F). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C e G) e BRS marataoã (D e H).

3.3. Atividade da dismutase de superóxido (SOD)

A atividade da SOD, 6 HAI, nos genótipos de feijão-de-corda suscetíveis, BRS pujante (Figura 9A) e CE-31 (Figura 9B), ambos inoculados com o CPSMV, não diferiu, significativamente, quando comparada com as respectivas plantas controles. Já a atividade da SOD nos genótipos resistentes, BRS rouxinol (Figura 9C) e BRS marataoã (Figura 9D), ambos inoculados com o vírus, foi 57,5% e 41,9% superior em relação às respectivas plantas controles, nesse mesmo tempo de avaliação (6 HAI). Nos demais tempos avaliados, não houve diferenças significativas na atividade da SOD.

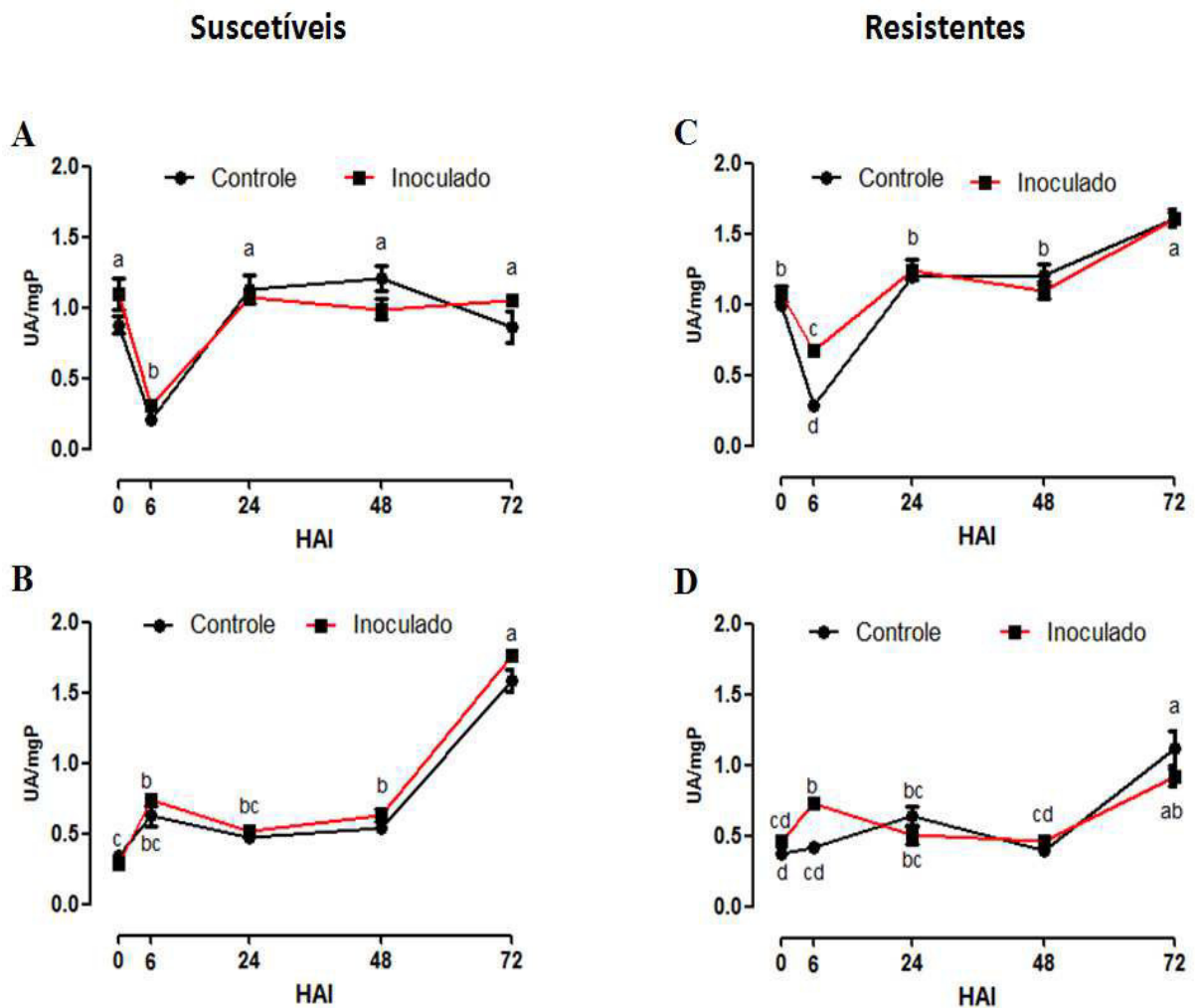


Figura 9. Atividade enzimática de dismutase de superóxido (SOD) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

3.4. Atividade da catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da CAT nas folhas secundárias do genótipo suscetível BRS pujante, inoculado com o CPSMV, foi 43,5% e 68,8% maior quando comparada com plantas controles, respectivamente, em 24 e 72 HAI (Figura 10A).

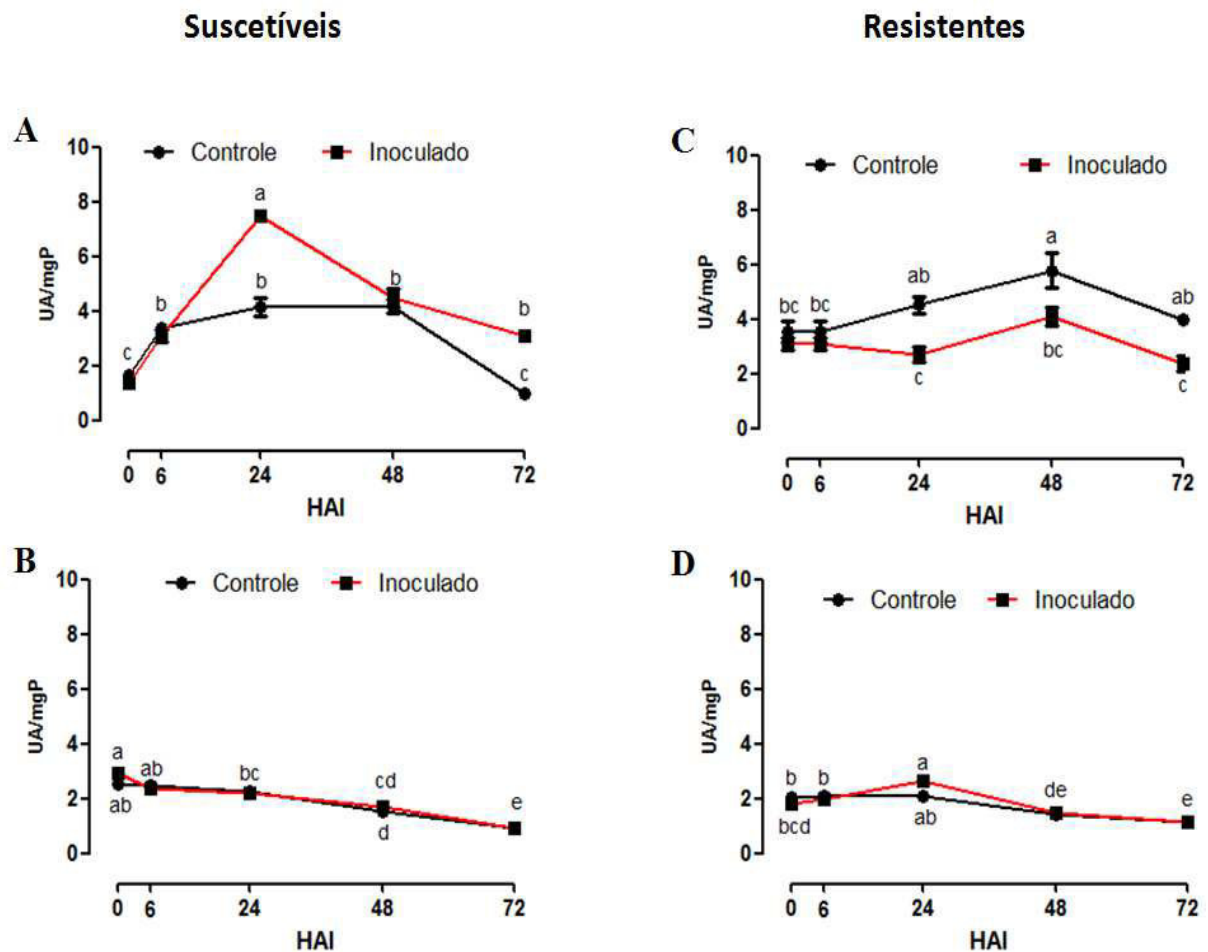


Figura 10. Atividade enzimática de catalase (CAT) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

No outro genótipo suscetível, CE-31, não houve diferenças significativas da CAT em nenhum tempo analisado, entre plantas inoculadas com o CPSMV e controles (Figura 10B). No genótipo resistente, BRS rouxinol, a atividade da CAT foi 40,5%, 30,3% e 40,8% menor nas plantas inoculadas com o CPSMV, comparando com plantas controles, respectivamente, 24, 48 e 72 HAI (Figura 10C). O outro genótipo resistente, BRS marataoã, não apresentou diferenças significativas na atividade da CAT nos períodos analisados, comparando plantas inoculadas e controles (Figura 10D).

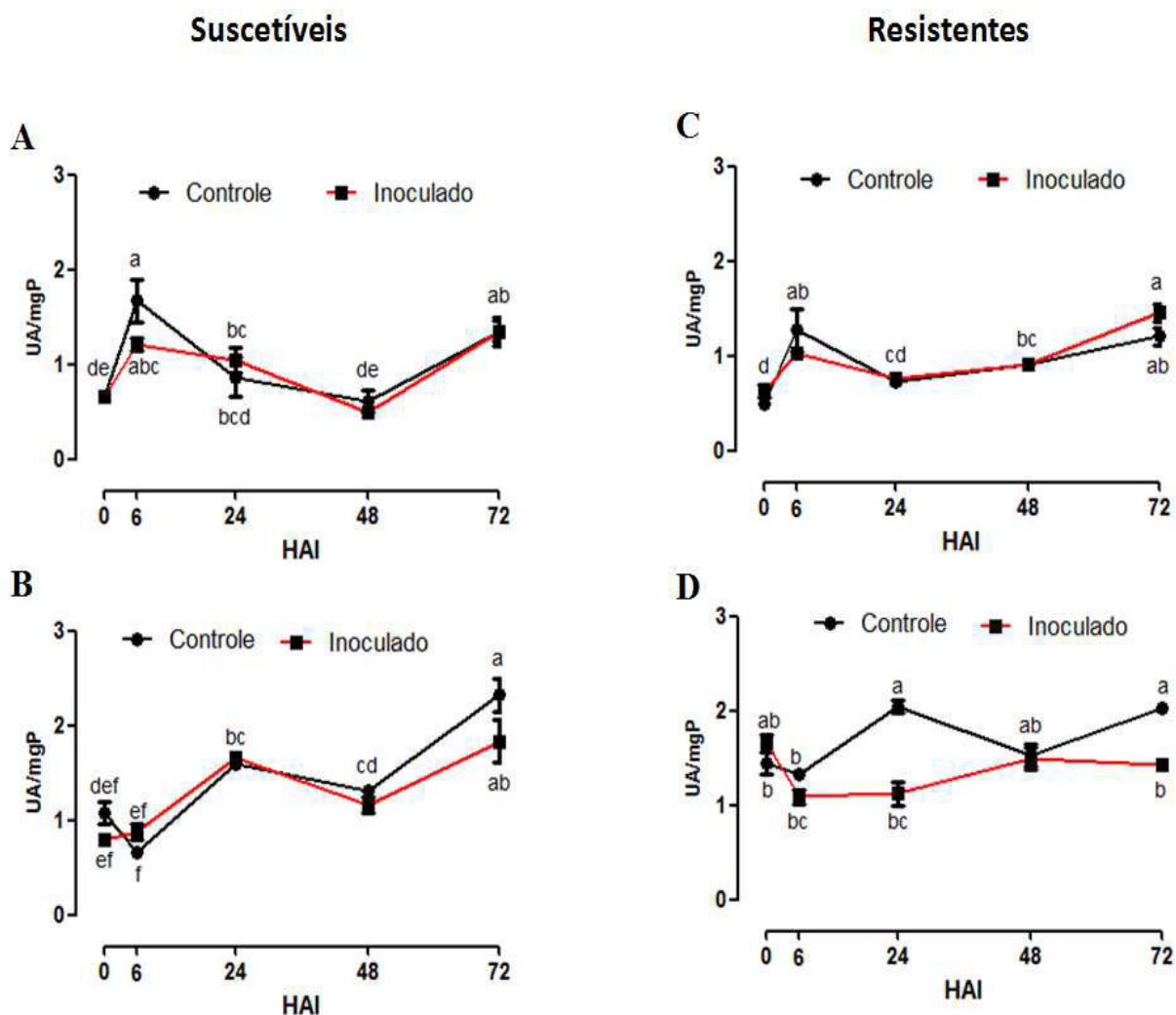


Figura 11. Atividade enzimática de peroxidase do ascorbato (APX) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

Os genótipos de feijão-de-corda suscetível, BRS pujante e CE-31, e o genótipo resistente, BRS rouxinol, não apresentaram diferenças significativas na atividade da APX nos períodos analisados, comparando plantas inoculadas com o CPSMV e respectivas plantas controles (Figura 11A, B e C). No entanto, diferenças significativas na atividade da APX foram encontradas no genótipo resistente, BRS marataoã. Nesse caso, APX foi 41,0% e 21,7% menor nas plantas inoculadas com CPSMV, em relação às plantas controles, 24 e 72 HAI, respectivamente (Figura 11D), não havendo diferenças significativas nos demais tempos avaliados.

3.5. Teor de peróxido de hidrogênio

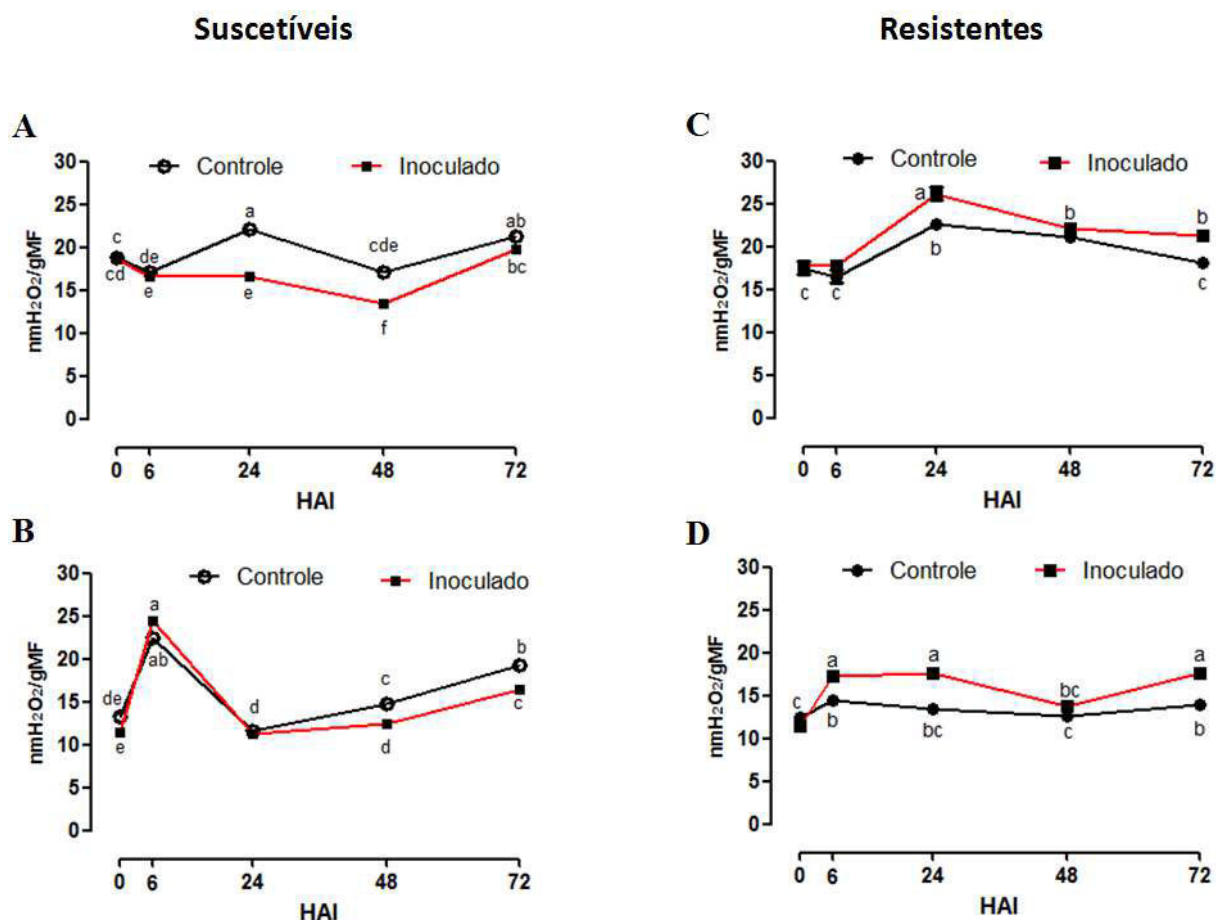


Figura 12. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas secundárias de feijão-de-corda controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

O conteúdo de H₂O₂ nas folhas secundárias do genótipo suscetível BRS pujante, inoculado com o CPSMV, foi 27,3% e 20,9% menor em relação às plantas controles, 24 e 48 HAI, respectivamente (Figura 12A). No genótipo suscetível CE-31 inoculado com o vírus, foi registrado, também, conteúdo de H₂O₂ 14,7% e 15,3% menor do que nas plantas controle, 48 e 72 HAI (Figura 12B), respectivamente. Já para o genótipo resistente BRS rouxinol, inoculado com o CPSMV, houve aumento de 11,0% e 14,6% no conteúdo de H₂O₂, 24 e 72 HAI, quando comparados com plantas controles (Figura 12C). No outro genótipo resistente, BRS marataoã, também inoculado com o vírus, o conteúdo de H₂O₂ foi 16,4%, 23,6% e

20,7% mais elevado que nas plantas controle, 6, 24 e 72 HAI (Figura 12D). Nos demais tempos avaliados, não houve diferenças significativas entre plantas inoculadas e controles.

3.6. Análise dos transcritos para SOD, CAT e APX

Para análise dos transcritos algumas etapas precedentes foram necessárias: extração de RNA total, avaliação da integridade do RNA extraído das folhas de feijão-de-corda, e produção e avaliação da qualidade da biblioteca de cDNAs, e RT-PCR semiquantitativo. Os resultados dessas etapas estão relatados a seguir.

3.6.1 Integridade do RNA total e qualidade da biblioteca de cDNA

A integridade dos RNAs extraídos das amostras de folhas secundárias de feijão-de-corda foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Figura 13). A boa definição, no gel, das bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico (setas) indica qualidade adequada das preparações para construção da biblioteca de cDNA.

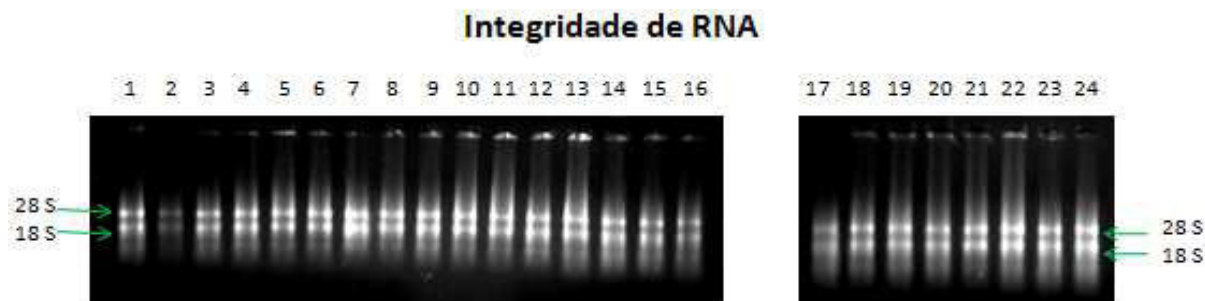


Figura 13. Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,2% m/v), dos RNAs totais extraídos das folhas secundárias de feijão-de-corda. As bandas correspondentes às subunidades 28 S e 18 S do RNA ribossômico estão assinaladas com setas. Genótipos suscetíveis ao CPSMV: BRS pujante controle (1-3) e inoculado com CPSMV (4-6); CE-31 controle (7-9) e inoculado com CPSMV (10-12). Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol controle (13-15) e inoculado com CPSMV (16-18); BRS marataoã controle (19-21) e inoculado com CPSMV (22-24). Amostra aplicada: 500 ng de RNA total. Corrida: 130 mA/gel, por 30 min. Revelação das bandas: brometo de etídio (0,5 µg/mL). As bandas de RNA foram visualizadas por exposição do gel à luz UV, sendo foto-documentada.

Para a RT-PCR semiquantitativa, foram utilizados iniciadores (*primers*) do gene *PhaFbox* (gene constitutivo do feijão-de-corda). As bandas correspondentes à amplificação da região de domínio do gene *PhaFbox* de todas as amostras estão apresentadas na Figura 14, onde ficou demonstrado que a biblioteca de cDNA está em boas condições para serem utilizadas na análise dos genes da SOD, CAT e APX.

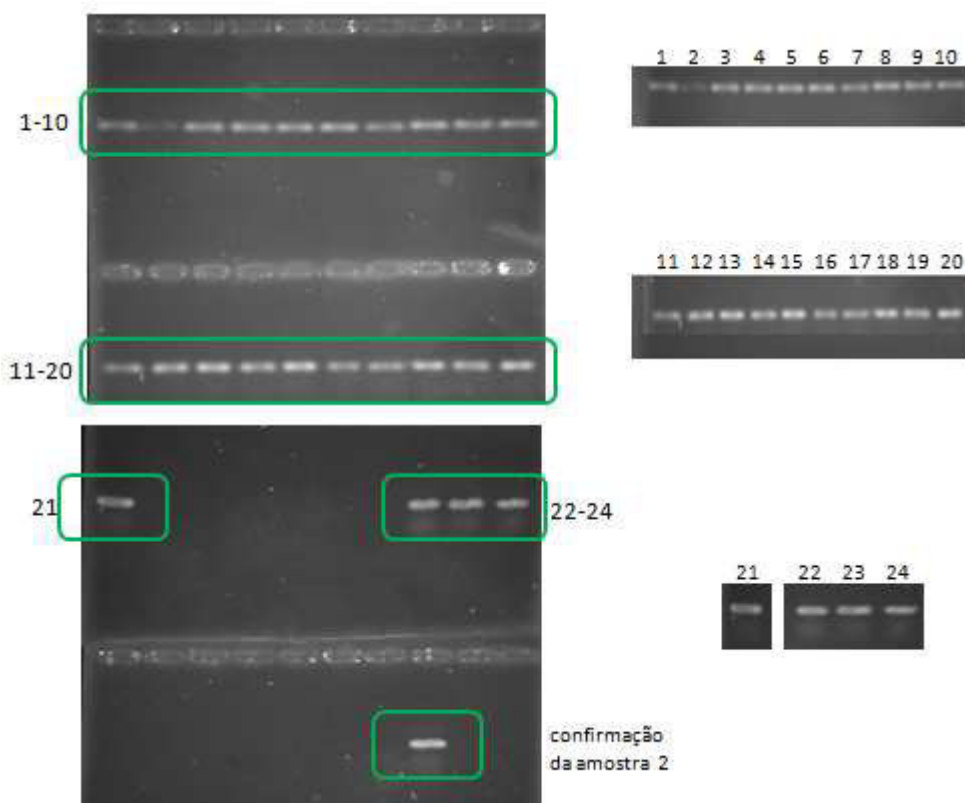


Figura 14. Perfil eletroforético, em gel de agarose (1,2% m/v), dos cDNAs resultantes da amplificação, por RT-PCR, do gene *PhaFbox* (constitutivo) das amostras das folhas secundárias de feijão-de-corda. Genótipos suscetíveis ao CPSMV: BRS pujante controle (1-3) e inoculado com CPSMV (4-6); CE-31 controle (7-9) e inoculado com CPSMV (10-12). Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol controle (13-15) e inoculado com CPSMV (16-18); BRS marataoã controle (19-21) e inoculado com CPSMV (22-24). Amostra aplicada: 5µL. Corrida: 130 mAmp/gel, por 30 min.,. Revelação das bandas: brometo de etídio (0,5 µg/mL). As bandas de RNA foram visualizadas por exposição do gel à luz UV, sendo foto-documentada.

3.6.2 RT-qPCR

Para os experimentos de RT-qPCR, os iniciadores para os genes que codificam as enzimas SOD, CAT e APX, bem como para os genes normalizadores, estão referidos na Tabela 3. Quatro genes normalizadores foram testados e duas condições (plantas controles e inoculadas com o CPSMV) foram utilizadas. Esses dados e a relação V3/4 foram suficientes para normalizar os dados, visto que o valor g_{norm} V ficou abaixo do valor mínimo estabelecido $\leq 0,15$. Após normalização dos dados, análise dos genes alvo *CatI*, *ApxI* e *CuZnSOD I* foi realizada, 24 horas após inoculação.

No genótipo suscetível BRS pujante e no genótipo resistente BRS Marataoã, a expressão do gene *CuZnSOD I* não diferiu, significativamente, entre as plantas inoculadas com o CPSMV e plantas controles (Figura 15-A e D). No entanto, no genótipo suscetível CE-31 e no resistente BRS rouxinol, a expressão do *CuZnSOD I* nas plantas inoculadas foi significativamente menor em comparação com plantas controles (Figura 15-B e D).

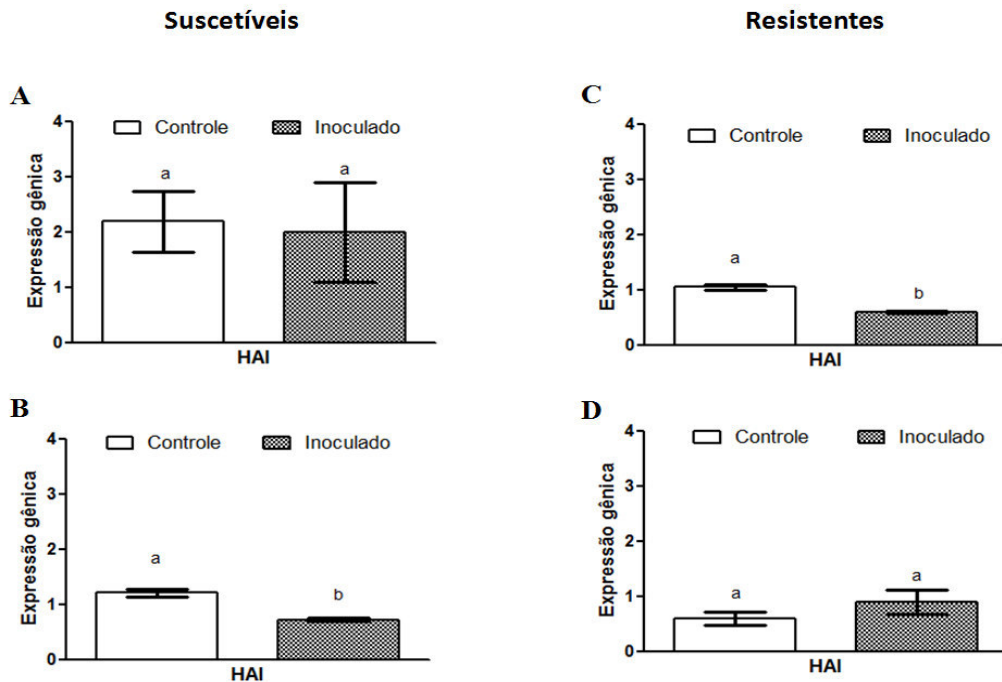


Figura 15. Expressão relativa do gene *CuZnSOD I*, que codifica para a enzima CuZnSOD, avaliada 6 dias após a inoculação com CPSMV (6 HAI). Genótipos suscetíveis ao CPSMV: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

A expressão do gene *APX1*, que codifica a isoforma APX, não apresentou diferenças significativas entre as plantas inoculadas com o CPSMV e controles, no caso dos genótipos resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) e do genótipo suscetível CE-31 (Figura 16 - B, C e D). No entanto, nas plantas do genótipo suscetível BRS pujante houve intensa expressão do gene *APX1*, em comparação com as respectivas plantas controles (Figura 16 A).

O gene que codifica a isoenzima *CAT1* não apresentou diferença significativa em sua expressão, tanto nos genótipos suscetíveis quanto nos genótipos resistentes, comparando as plantas inoculadas com o CPSMV e respectivas plantas controles (Figura 17).

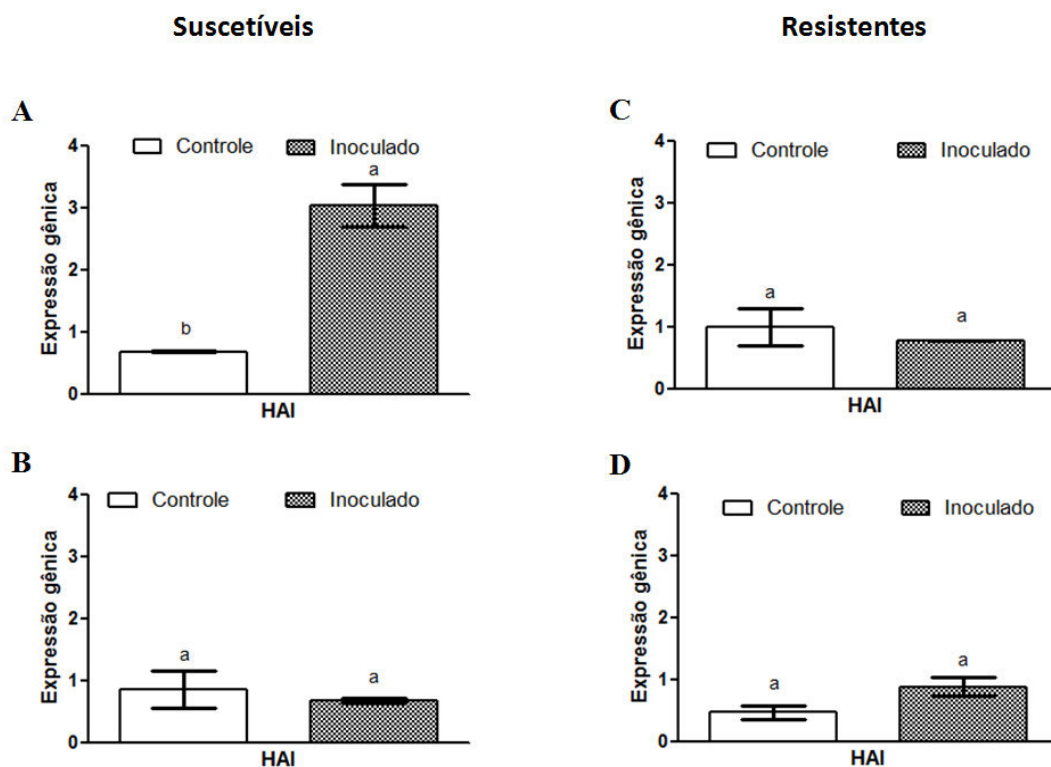


Figura 16. Expressão relativa do gene *APX1*, que codifica para a isoenzima APX1, avaliada 6 horas após a inoculação com CPSMV (6 HAI). Genótipos suscetíveis ao CPSMV: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

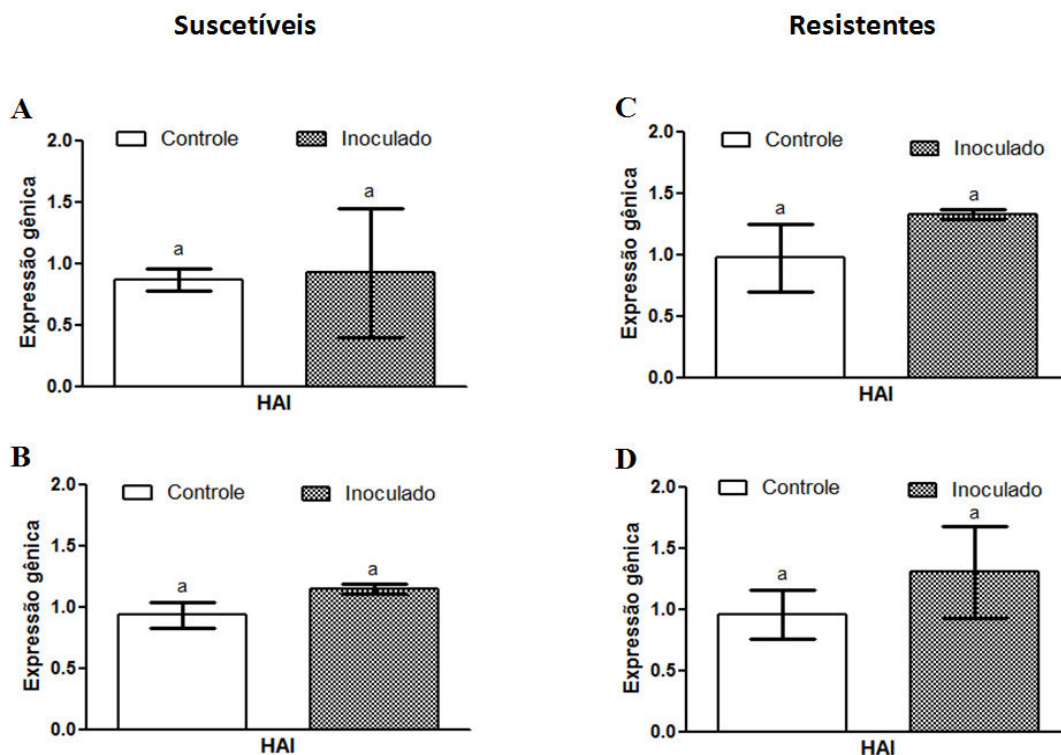


Figura 17. Expressão relativa do gene *CAT1*, que codifica para a isoenzima CAT1, avaliada 6 horas após a inoculação com CPSMV (6 HAI). Genótipos suscetíveis ao CPSMV: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes ao CPSMV: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

4. DISCUSSÃO

4.1. Análise da sintomatologia e presença do CPSMV

As viroses debilitam as plantas, tornando-as mais suscetíveis a outras doenças causadas por fungos, bactérias ou nematóides. As viroses se destacam também por serem de difícil controle no campo. Assim, uma cultivar resistente possui genes que garantem a sanidade da planta mesmo que o vírus venha a infectá-la (Pinto, 2003).

Quanto à virose provocada pelo vírus do mosaico severo do caupi, o feijão-de-corda pode ser classificado como: suscetível, resistente ou imune. Essa classificação está relacionada às reações sintomáticas e na presença do vírus na planta.

Genótipos de feijão-de-corda suscetível ao CPSMV caracterizam-se pelo desenvolvimento de sintomas por volta de três dias após inoculação do vírus, apresentando vários sintomas severos com o avançar da infecção. Os genótipos resistentes ao CPSMV apresentam mosaico leve após vários dias de infecção e apresentam replicação do CPSMV. Enquanto nos genótipos imunes não é verificada a presença de vírus e nem de sintomas (Nogueira, 2010).

A presença de lesões cloróticas em 72 HAI e a presença do vírus identificada em 6 e 72 HAI nos genótipos BRS pujante e CE-31, caracterizam esses genótipos como suscetíveis, enquanto a não presença de lesões cloróticas e nem de vírus em 72 HAI, mas a presença do vírus em 6 HAI identificadas nos genótipos BRS rouxinol e BRS marataoã, classificam esses genótipos como resistentes.

Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo foram encontrados por Lima *et al.*, (2011), na avaliação de genótipos de feijão-de-corda à infecção pelos vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV), em que foram avaliados 33 genótipos pela presença de sintomas e presença viral, classificando esses genótipos em suscetíveis, resistentes e imunes à infecção por esses vírus.

4.2. Teor do íon superóxido (O_2^-)

O superóxido é um radical livre formado pela conversão do oxigênio molecular O_2 em O_2^- pela adição de um elétron, sendo um processo mediado, provavelmente, por peroxidases ou NAD(P)H oxidases associadas à membrana, ou mesmo por lipoxigenases a partir de ácidos graxos e O_2 (Doke *et al.*, 1996). Quando o O_2 é reduzido durante o transporte de elétrons na via fotossintética, nos cloroplastos, em torno de 1 a 2% do O_2 consumido conduz à geração de O_2^- . O superóxido é mais reativo que OH^- , mas ambas as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem causar peroxidação da membrana lipídica e enfraquecimento celular (Halliwell, 2006).

Os primeiros estudos associando ROS com a defesa vegetal foram realizados por Doke (1983) e Doke & Ohashi (1988) onde relataram a produção de O_2^- nas interações incompatíveis nos patossistemas batata (*Solanum tuberosum*) e *Phytophthora infestans* e fumo (*Nicotiana tabacum* L.)-vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*, TMV).

A Figura 7C e 7D mostram que houve aumento imediato (0 HAI) do íon superóxido (O_2^-), nas folhas secundárias dos genótipos de feijão-de-corda resistentes, BRS rouxinol e

BRS marataoã, ambos inoculados com o CPSMV, em comparação, com as respectivas plantas controle, não inoculadas com o vírus, fato que não foi verificado no caso dos genótipos de feijão-de-corda suscetíveis, em nenhum tempo estudado (Figs. 7 A e B). Esses achados foram reforçados pela maior detecção do O_2^- *in situ*, nas folhas dos genótipos resistentes (Fig. 8). Rápido aumento do conteúdo de O_2^- nos genótipos resistentes sugere o reconhecimento do patógeno por essas plantas e a ocorrência de explosão oxidativa, resposta imediata que habilita as plantas a armarem rápidas respostas de defesa, locais e sistêmicas, que podem resultar no controle da infecção pelo vírus (Aude Aznaret *et al.*, 2015; Fernades, 2004). Por outro lado, as plantas dos genótipos de feijão-de-corda suscetível não foram capazes de reconhecer o patógeno e, assim, inábeis em promover reação imediata à infecção viral.

Em outro estudo, plantas de tabaco infectadas com *Potato virus Y^{NTN}*, também demonstraram um alto acúmulo inicial de O_2^- em plantas transgênicas de tabaco e conseqüente diminuição de sintomas provocados pela infecção de *Potato virus Y^{NTN}* (Spoustová *et al.*, 2015). Resultados similares evidenciando o papel do superóxido na defesa da planta contra o ataque de patógenos foram observados, também, em folhas de morango, cultivar Pajaro, inoculadas com um patógeno avirulento *Colletotrichum fragariae*, onde foi verificado um rápido aumento de superóxido nessas folhas (Salazar, 2006) e confirmadas quantitativa e qualitativamente por Carlos, (2011).

4.3. Atividades de SOD, CAT, APX e expressão gênica

Expor as plantas a estresses bióticos e abióticos pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Para sua própria proteção contra estes derivados de oxigênio tóxicos, as células das plantas e suas organelas, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, empregam sistemas de defesa antioxidante. Os componentes desses sistemas são enzimas e outras moléculas não enzimáticas, que desempenham papéis importantes na homeostase redox das plantas. O sistema enzimático inclui as SODs, (PPOs), APXs, CATs e POXs, (Gulsen *et al.*, 2010; Gill & Tuteja, 2010) e os não enzimáticos, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina E, flavonoides, prolina, glutatona, dentre outras (Davar *et al.*, 2013).

As SODs são enzimas antioxidantes intracelulares muito eficazes, presente em todos os organismos aeróbicos e naqueles compartimentos subcelulares propensos à explosão oxidativa, devido aos estresses abióticos e/ou bióticos. Nesses diversos compartimentos subcelulares, são encontradas diferentes isoformas, classificadas segundo seus cofatores

metálicos: cobre/zinco (Cu/Zn-SOD); manganês (Mn-SOD); e ferro (Fe-SOD) (Gill & Tuteja, 2010). As SODs se constituem na primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados de O_2^- , pois catalisam a dismutação desse radical a peróxido de hidrogênio (Ehsani-Moghaddam *et al.*2006).

Pelo fato do teor de O_2^- ter sido maior, em 0 HAI, para os genótipos resistentes, BRS rouxinol e no BRS marataoã, a maior atividade de SOD nesses genótipos resistentes, em 6 HAI (Fig. 9), em comparação com as respectivas plantas controle, se justifica como para evitar a geração excessiva de O_2^- , que poderia vir a causar danos às células vegetais (Ehsani-Moghaddam *et al.*2006). Da mesma forma, também se justifica não ter havido diferenças significativas na atividade de SOD para os genótipos suscetíveis, BRS pujante e CE-31, pelo fato de não ter havido aumento imediato de O_2^- nessas plantas após o contato com o vírus (Figura 9). Por outro lado, a expressão do gene *CuZnSOD I*, para a isoforma CuZnSOD (Figura 15), não acompanhou a cinética de atividade de SOD. Aparentemente, essa isoforma CuZnSOD não foi a responsável pelo aumento em atividade de SOD observado (Fig. 9) para os dois genótipos resistentes, BRS rouxinol e no marataoã, em 6 HAI.

Trabalhos realizados com SOD indicaram o envolvimento dessas enzimas com a resistência da planta ao ataque de patógenos. O aumento da atividade da SOD, observada nos genótipos resistentes, sugerem também uma tentativa de superação dos danos causados pela infecção com vírus, observadas no patossistema *Hibiscus cannabinus L* e *H. sabdariffa* (chamadas na Índia de mesta) e o *Mesta yellow vein mosaic virus* (Arpita Chattergee & Subrata K. Gosh, 2008).

Folhas de cultivares de morangos resistentes e suscetíveis a *Mycosphaerella fragariae* apresentaram resultados similares, quando infectadas as cultivares resistentes apresentaram aumento da atividade da SOD maior que nas cultivares suscetível (Ehsani-Moghaddam *et al.*2006). Resultados idênticos, também, foram encontrados em plantas de tabaco infectadas com *Potato virus Y^{NTN}* (Spoustová *et al.*, 2015) onde plantas suscetíveis não demonstraram diferenças significativas na atividade da SOD.

A CAT é uma enzima que elimina H_2O_2 através de uma reação em que H_2O_2 é transformado em O_2 e H_2O . Alternativamente, as calatases em condições de baixa concentração de H_2O_2 podem usar outros doadores de elétrons como metanol, etanol, formaldeído, ácido fórmico, ascorbato e fenóis.

Sendo assim, a CAT desempenha papel específico, protegendo as células dos efeitos tóxicos do excesso de H_2O_2 , que, embora seja uma substância importantíssima para a defesa

das plantas, funcionando tanto como um agente diretamente tóxico ao patógeno como molécula sinalizadora da expressão de vários genes de resistência, pode ser letal, também, para as próprias células vegetais (Patel *et al.* 2011). As plantas possuem várias isoformas de CATs, presentes nos peroxissomas e glioxissomas (Resende *et al.*, 2003).

A APX possui função particularmente importante na resistência das plantas ao stress, é uma enzima que atua usando ascorbato como doador de elétrons, decompõe H_2O_2 em água, formando monodehidroascorbato (MDA) (Yoshimura *et al.*, 2000). Para além dos seus efeitos antioxidantes diretos, as APXs possuem função particularmente importante na resistência das plantas ao estresse (Shigeoka *et al.*, 2002).

No presente estudo, foram verificadas tendência de baixa atividade de CAT no genótipo resistente BRS rouxinol (Fig. 10C) e baixas atividades de APX no genótipo resistente BRS marataoã (Fig. 11D). A CAT e APX são enzimas responsáveis pela remoção de H_2O_2 . O H_2O_2 funciona, também, acionando mecanismos complexos de defesa das plantas contra patógenos. Essa tendência verificada de baixas atividades de CAT e APX, respectivamente nos genótipos resistente BRS rouxinol e marataoã, podem ter sido responsáveis pela pequena tendência de maiores teores de H_2O_2 nesses genótipos de feijão-de-corda, em relação aos genótipos suscetíveis (Fig. 12), mas suficientes para permitir que essas plantas utilizassem o H_2O_2 na sua resposta de defesa à infecção pelo CPSMV. Fatos contrários foram observados nos genótipos suscetíveis. Ao contrário do genótipo resistente BRS rouxinol, o genótipo suscetível ao CPSMV, BRS Pujante, apresentou alguns valores elevados da CAT. Tal fato sugere ter havido remoção do H_2O_2 a um teor que não permitiu essa planta de utilizar essa molécula para acionar seus mecanismos de defesa. Com relação à atividade de APX, não foi verificada diferenças significativas entre as plantas em estudo do genótipo BRS pujante (Fig. 11A) O genótipo suscetível CE-31 não mostrou diferença alguma tanto na atividade de CAT (Fig. 10B), como na de APX (Fig. 11B) nas plantas inoculadas com CPSMV em relação aos respectivos controles, sugerindo que não houve aumento e nem diminuição de H_2O_2 , ou seja, que, aparentemente, essa estabilidade de concentração não foi suficiente para acionar respostas de defesa dependentes de H_2O_2 , no genótipo suscetível CE-31. A expressão gênica das isoformas da APX e CAT (APX1 e CAT1) foi consistente com as atividades da CAT e APX registradas em 6 HAI (Figs. 16 e 17), com exceção da APX1 no genótipo BRS pujante que não acompanhou a atividade da APX, aparentemente, essa isoforma não é responsável pela atividade detectada da APX em 6 HAI.

As CATs se constituem em uma das principais vias de degradação do H₂O₂. As APXs também estão envolvidas na eliminação rápida de H₂O₂, pois possuem alta afinidade ao H₂O₂, removendo-o mesmo quando em baixas concentrações, ao contrário das CATs, que atuam removendo o excesso de peróxido de hidrogênio (Mittler, 2002). Portanto, a inibição da atividade de CATs e de APXs resulta no aumento da concentração de H₂O₂ e ativação da resistência sistêmica adquirida (SAR) (Gayatri Devi *et al.*, 2012).

Resultados similares aos encontrados neste trabalho relacionados com a atividade de CATs, são citados em pesquisas realizadas com plantas suscetíveis e resistentes ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) e ao vírus do mosaico do tomate (ToMV), nos quais foi observado decréscimos de atividade de CAT em todas as plantas inoculadas com TMV e ToMV (Madhusudhan *et al.*, 2009). Outros resultados similares foram encontrados em um trabalho realizado com plantas denominadas popularmente como grão de bico em que genótipos resistentes ao *Fusarium oxysporum* diminuíram a atividade da CAT, enquanto genótipos suscetíveis aumentaram (Gayatri Devi *et al.*, 2012). Num outro trabalho, resultados similares àqueles aqui encontrados, relacionados com a inibição da atividade de APX, foram relatados, em plantas de tabaco inoculadas com TMV e tratadas com ácido salicílico exógeno mostraram inibição da APX em associação com aumento da resistência da planta à infecção viral (Durner e Klessig, 1995). Já foram relatados, também, resultados similares aos da CAT e APX em estudos realizados com diferentes genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* Corda f. *sp.avenae* (Figueiró *et al.*, 2013).

4.4. Teor de H₂O₂

O peróxido de hidrogênio, assim como íon superóxido, é espécie reativa de oxigênio, portanto faz parte da explosão oxidativa, um processo importante nas respostas de defesa da planta contra patógenos.

O H₂O₂ possui relativamente longa meia-vida e seu excesso nas células das plantas lidera o estresse oxidativo. É relatado que o H₂O₂ pode ser diretamente tóxico aos patógenos. Alternativamente, pode contribuir para reforçar a parede celular vegetal, tanto participando em interligações de hidroxiprolinas e glicoproteínas ricas em prolina à matriz de polissacarídeos ou aumentando a taxa de formação de lignina por meio da atividade das peroxidases. Ambos os mecanismos tornam a parede celular mais resistente à penetração do

patógeno. O H₂O₂ também intervém na biossíntese do ácido salicílico (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

Os genótipos suscetíveis (BRS pujante e CE-31) demonstraram menor conteúdo de peróxido de hidrogênio (Figs. 12A e 12B) nas plantas inoculadas em relação às controles em dois tempos do período de infecção analisado, enquanto os genótipos resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) um leve aumento de H₂O₂ em dois ou mais tempos (Figs. 12C e 12D), nas plantas com vírus em relação às plantas controles durante todo o período investigado, após inoculação com o CPSMV. Esses resultados são consistentes com as atividades da SOD, CAT e APX, além de corroborados pela afirmação feita por Bhattacharjee, (2012) sobre os papéis do H₂O₂: em baixa concentração agem como um sinal molecular, envolvendo sinalização e ativação de genes de defesa contra vários estresses bióticos e abióticos. Já em alta concentração, ele é o mais responsável pela a morte programada da célula em respostas como HR (Bhattacharjee, 2012).

Alguns resultados similares aos encontrados neste estudo relacionando o H₂O₂ foram observados em plantas de tabaco infectadas com *Potato virus Y^{NTN}*, neste estudo houve acúmulo de H₂O₂ em plantas transgênicas de tabaco e conseqüente diminuição de sintomas provocados pela infecção de *Potato virus Y^{NTN}* diminuindo a suscetibilidade da planta a essa infecção (Spoustová *et al.*, 2015). Pesquisas realizadas com plantas suscetíveis e resistentes ao vírus do masaico do tabaco (TMV) e ao vírus do mosaico do tomate (ToMV), também, demonstraram acúmulo de H₂O₂ nas plantas resistentes inoculadas com TMV e ToMV, sendo associado este resultado com a resistência das plantas a estas infecções (Madhusudhan *et al.*, 2009)

CAPÍTULO II

CINÉTICA DE ENZIMAS RELACIONADAS AO METABOLISMO DE FENÓIS EM GENÓTIPOS DE FELJÃO-DE-CORDA RESISTENTES E SUSCETIVEIS, DESAFIADOS COM CPSMV

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos abrangem extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático de carbono (C₆) contendo um ou mais grupos hidroxílicos ligados. Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados do ácido benzóico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonóides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas. Em geral, tendem a ser solúveis em água, uma vez que ocorrem frequentemente na forma de glicosídeos e localizados usualmente nos vacúolos celulares. As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos abrangem as vias do shiquimato/arogenato, acetato/malonato e acetato/mevalonato (Schwan-Estrada *et al.*, 2008).

A fenilalanina amônia liase (PAL) participa na via do shiquimato/arogenato sendo responsável pela desaminação não oxidativa da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia (Figura 18). O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas.

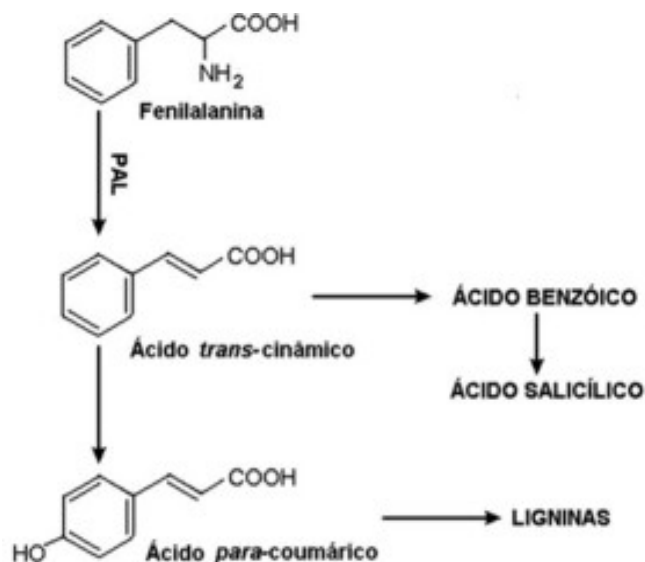


Figura 18 Reação de fenilalanina amônia liase (PAL) na via do shiquimato/arogenato. Fonte: Peres, 2015

A peroxidase (POX) é uma classe de enzimas presente em tecidos de animais, plantas e microrganismos, que catalisa a oxidorredução entre H₂O₂ (Figura 19) e vários redutores,

participa de uma ampla variedade de processos fisiológicos nas plantas, tais como a lignificação, suberização, formação e reticulação de componentes da parede celular, catabolismo de auxinas, senescência, proteção contra ataque de patógenos, insetos e estressores abióticos.

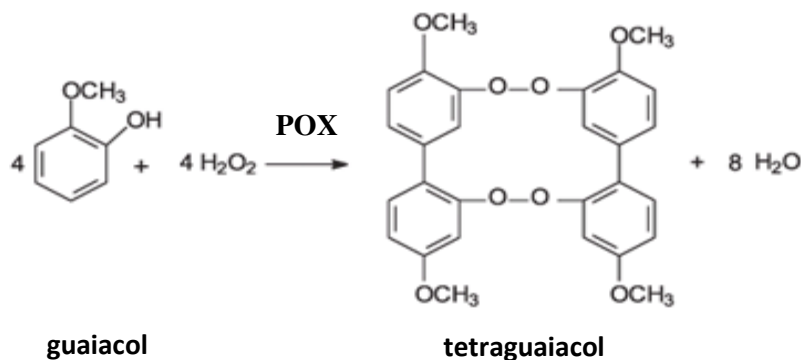


Figura 19 Reação da peroxidase de fenóis (POX). Fonte: Zeraik *et al.*, 2008

A polifenoloxidase (PPO) é uma enzima que está relacionada, também, com o metabolismo de compostos fenólico, catalisando reações oxidativas, usando oxigênio molecular durante a oxidação de fenóis (Figura 20).

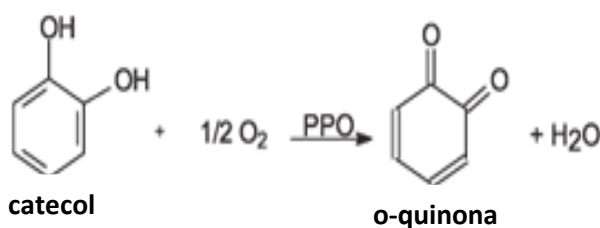


Figura 20 Reação da polifenoloxidase (PPO). Fonte: Zeraik *et al.*, 2008

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários, dentre os quais os compostos fenólicos, que agem como defesa contra patógenos, suporte mecânico e proteção contra radiação. No caso de defesa contra patógenos é necessária a participação das enzimas PAL, PPO e POX, já que são enzimas relacionadas ao metabolismo de compostos fenólicos e envolvidas na defesa da planta.

Para evidenciar a participação da PAL e POX na resistência de feijão-de-corda ao ataque de patógenos, em plantas de feijão-de-corda, inoculadas com *Colletotrichum destructivum*, foi verificado o aumento da resistência após a pulverização com um indutor de resistência vegetal Acibenzolar S-Metil (ASM), tal fato foi associado com rápido e efetivo

aumento na atividade de uma enzima-chave na via dos fenilpropanóides a PAL (Latunde-Dada & Lucas, 2001). No patossistema cacau-*Verticilium dahlia* e Cavalcanti (2000) e Resende et al. (2002) observaram aumento na atividade da enzima peroxidase, destacando ser essa uma importante alteração fisiológica no processo de resistência induzida, em resposta à pulverização de plântulas de cacauzeiro com ASM.

O genótipo de feijão-de-corda BRS rouxinol desafiado por *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta do caule, demonstrou aumento da atividade da PAL e POX quando pulverizado com o indutor de resistência ASM (Athayde Sobrinho et al., 2005)

Zeeshan Siddique *et al.*, (2014) verificaram aumento da atividade de PPO, e participação constitutiva de POX, PAL e conteúdo fenólico em folhas de genótipos de algodoeiro infectados com *cotton leaf curl Burewala vírus*, tendo sido esses resultados associados com a resistência da planta ao vírus.

Diante do leve aumento de peróxido de hidrogênio (Figs. 12C e 12D), aqui verificados nos genótipos de feijão-de-corda (BRS rouxinol e BRS Marataoã) resistentes a infecção pelo CPSMV, podendo essa ROS atuar como sinalização molecular e atuar como substrato para a POX, houve a possibilidade de verificação do envolvimento de compostos fenólicos e enzimas relacionadas com seu metabolismo no mecanismo de resistência do feijão-de-corda ao CPSMV.

2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.1. Determinação da atividade de PAL

A atividade de PAL foi determinada segundo a metodologia de Tanaka *et al.*(1974) e Mori et al. (2001), adaptada às condições do experimento. A mistura reacional foi constituída de 0,1 mL do extrato proteico, 0,2 mL de L-fenilalanina 40 mM, 0,02 mL de β -mercaptoetanol 50 mM e 0,48 mL de Tampão tris-HCl 100 mM, pH 8,8. A mistura reacional foi incubada a 30 °C por 1 h. A reação foi parada pela adição de 0,1 mL de HCl 6 M e a absorbância medida a 290 nm. No branco do ensaio, a fenilalanina foi adicionada após a adição de HCl 6 M. A atividade de (PAL) foi determinada utilizando uma curva padrão construída a partir de concentrações de ácido trans-cinâmico (0,01 – 0,1 μ g de ácido trans-cinâmico. mL⁻¹) e definida como a variação da absorbância a 290 nm em 1 h e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP) (Ngadze *et al.*, 2012).

2.2. Determinação da atividade de POX

A metodologia utilizada foi a descrita por Urbanek *et al* (1991). Os substratos utilizados foram guaiacol e peróxido de hidrogênio, sendo o produto da reação (3,3' – dimetoxi – 4, 4' - bifenolquinona), quantificado. Na determinação da atividade, alíquotas de 0,8 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, foram adicionadas a 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 60 mM e 0,5 mL de guaiacol 20 mM. Essa mistura reacional foi deixada em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos. A reação foi iniciada com a adição de 0,2 mL de extrato de folhas dialisado e a formação do composto colorido mensurada a cada 20 segundos, até atingir 2 minutos, em 480 nm em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

2.3. Determinação da atividade de PPO

A atividade da PPO foi determinada segundo a metodologia de Oktay (1995), com algumas modificações. Inicialmente, 1,2 mL de tampão fosfato de potássio 75 mM (pH 6,5), foi deixado em banho-maria a 30 °C durante 10 minutos. Em seguida, 0,2 mL de extrato dialisado foram adicionados e a reação iniciada com a adição de 0,6 mL de solução de catecol 0,4% (m/v) preparada no mesmo tampão de reação. O registro da absorbância a 420 nm, em intervalos de 20 segundos, foi feito por 2 minutos. A unidade de atividade (UA) foi estabelecida como a variação da absorbância por minuto e expressa em unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mgP).

2.4. Determinação do teor de fenóis totais

O conteúdo de compostos fenólicos foi realizado segundo o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Andrade *et al.*, 2007). As folhas secundárias de feijão-de-corda foram maceradas na presença de metanol 95% (v/v), proporção 1:4 (m/v), e, em seguida, o homogeneizado centrifugado (13.000xg, 4 °C, 10 min), sendo o sobrenadante resultante coletado. Em tubos contendo 2 mL de água grau Milli-Q, 0,2 mL de extrato metanólico (diluindo-se em metanol 95%, se necessário) e 0,4 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 1N foram adicionados e homogeneizados em vórtex. Após 5 minutos, 0,4 mL de carbonato de

sódio (Na_2CO_3) a 2% (m/v) foram acrescentados em tubos de ensaio e estes deixados por 1h em repouso à temperatura ambiente, na ausência de luz. Em seguida, as absorvâncias foram mensuradas em 760 nm, em espectrofotômetro, sendo o metanol utilizado como branco. O reagente de Folin-Ciocalteu, de coloração amarela, forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos. Na quantificação dos fenóis totais, uma curva padrão de ácido pirogálico (10 a 80 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada. Os teores dos compostos fenólicos totais foram expressos em relação à miligrama de ácido pirogálico por grama de massa fresca (mg AP/gMF).

3. RESULTADOS

3.1. Atividade da fenilalanina amônia liase (PAL)

A atividade da PAL do genótipo suscetível BRS pujante, nas plantas inoculadas com o CPSMV, permaneceu constante durante todos os períodos de tempo analisados, mas menor em 58,4%, 36,5 e 40,8%, comparada com as plantas não inoculadas (controles), 6, 48 e 72 HAI, respectivamente (Figura 21A). No genótipo suscetível CE-31, houve tendência de aumento de atividade da PAL nas primeiras horas (0-24 h) independentemente se as plantas foram ou não inoculadas com o CPSMV. Entretanto, enquanto as plantas controles, não inoculadas, permaneceram com essa tendência de aumento de atividade da PAL, nas plantas inoculadas houve tendência de decréscimo, com o valor da atividade alcançando 63,4% daquele do controle, 72 HAI (Figura 21B). No genótipo resistente BRS rouxinol, a atividade da PAL foi 45,7% e 17,8% maior nas plantas inoculadas em relação ao controle, 48 e 72 HAI (Figura 21C). No genótipo resistente BRS marataoã, a atividade da PAL não foi diferente entre as plantas inoculadas e controles (Figura 21D), mas ambas mostraram tendência de aumento de atividade a partir de 24 HAI até 72 HAI, no final do experimento.

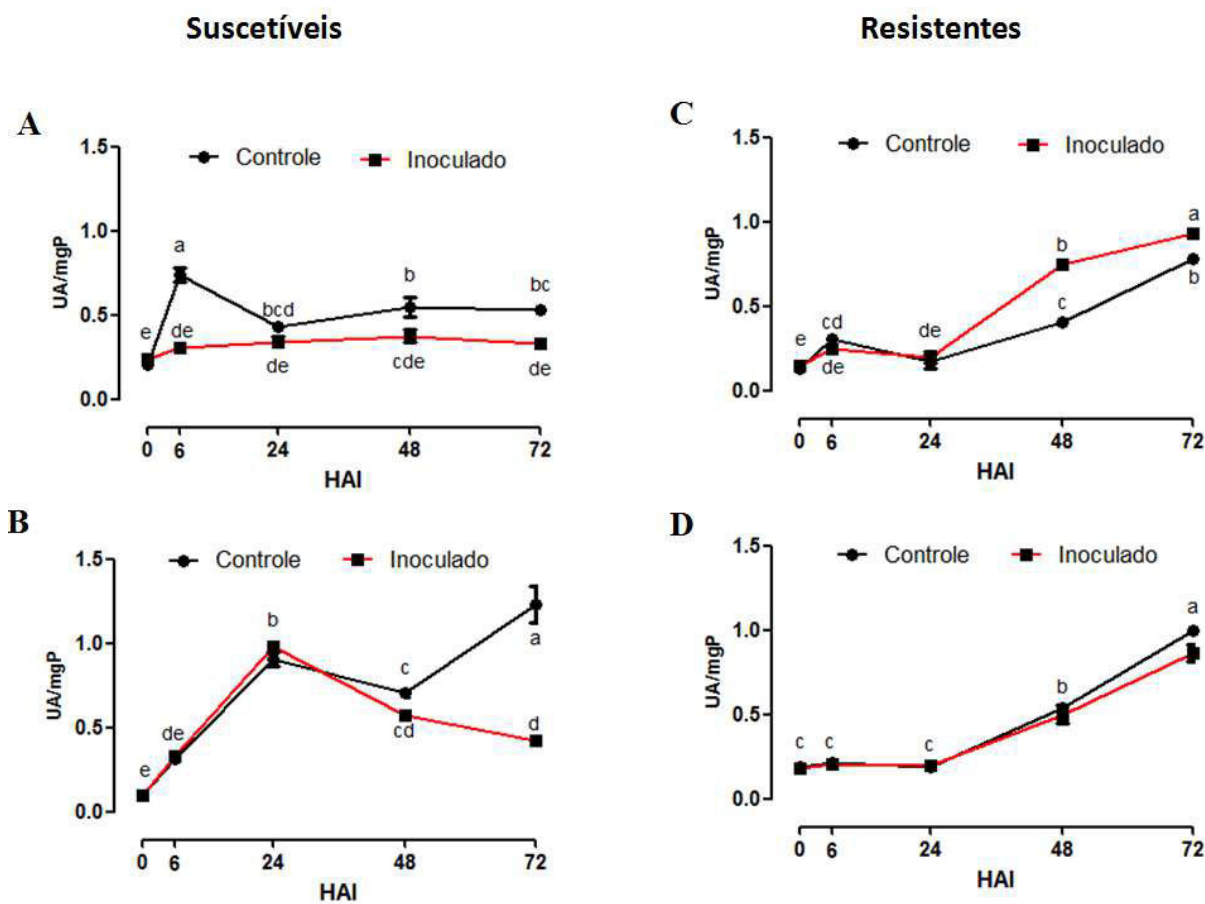


Figura 21. Atividade enzimática da fenilalanina amônia liase (PAL), em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

3.2. Atividade da peroxidase de fenóis (POX) e polifenol oxidase (PPO)

Nos genótipos suscetíveis, BRS pujante e CE-31, ambos desafiados com o CPSMV, houve decréscimos de 44,7% e 46,3% (Figura 22A) e de 72,9% e 52,1% (Figura 22B) da atividade de POX, em relação às plantas controle, não inoculados, 48 e 72 HAI, respectivamente. De modo contrário, no genótipo resistente BRS rouxinol, ocorreram aumentos de 22,6%, 35,1%, 39,5% e 75,8% da atividade da POX nas plantas inoculadas com o CPSMV, em relação às plantas controles, 6, 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Figura 22C). Entretanto, no outro genótipo resistente, BRS marataoã, embora a atividade de POX tenha mostrado tendência crescente bastante significativa, ao longo do período experimental, não

foram encontradas diferenças significativas de atividade entre as plantas desafiadas com o vírus em estudo e controles (Figura 22D).

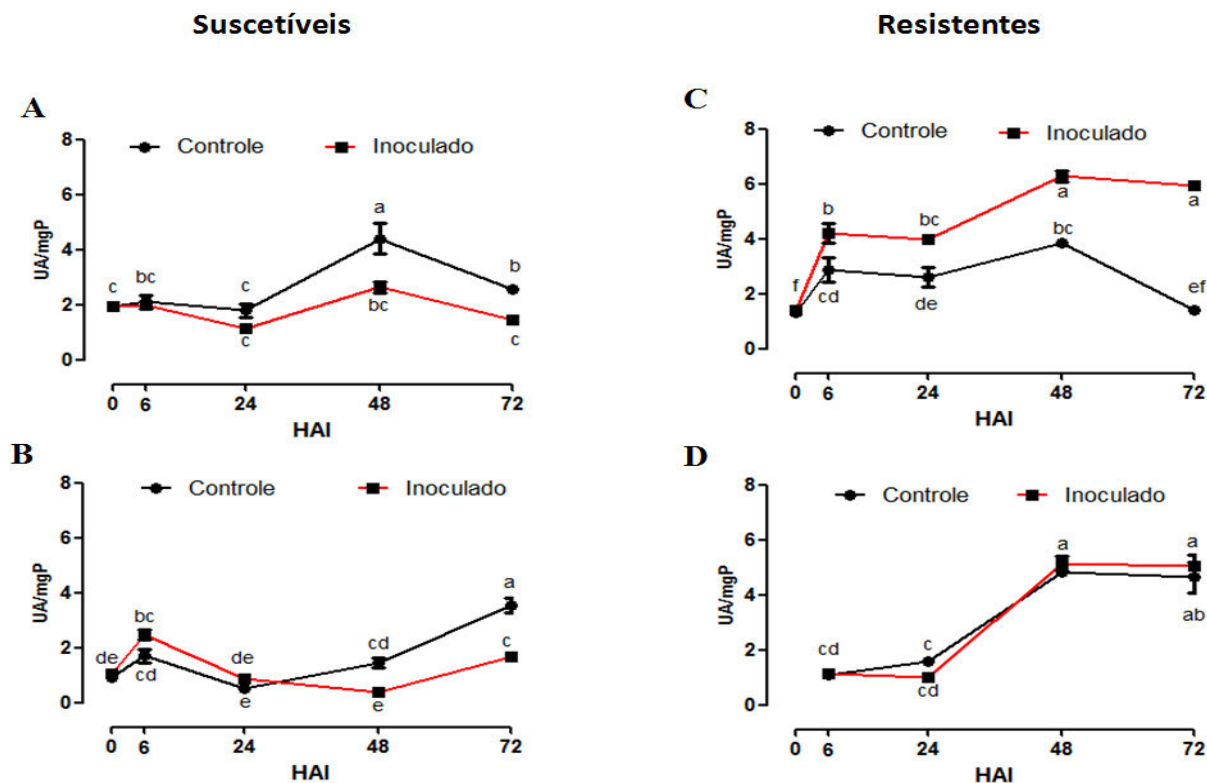


Figura 22. Atividade enzimática de peroxidase de fenóis (POX), em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

Em relação à atividade de PPO, no genótipo suscetível, BRS pujante, desafiado com o CPSMV, houve diminuição de 59,8% (Figura 23A) na atividade da PPO, em relação ao às plantas controles, 72 HAI, enquanto no genótipo suscetível CE-31 essa atividade foi menor em, 58,3% e 42,2% e (Figura 23B), em relação ao respectivo controle, 24 e 72 HAI. Ao contrário, nos genótipos resistentes, BRS rouxinol e BRS marataoã, quando inoculados, houve tendência dos valores de atividade de PPO serem mais elevados do que seus respectivos controles. De fato, houve aumento de 47,7, 47,6 e 29,2%, em 6, 48 e 72 HAI, respectivamente, nas plantas inoculadas do BRS rouxinol, em relação às controles, (Figura 23C). No outro genótipo resistente, marataoã, inoculado com o CPSMV, a atividade de PPO foi 30,8% mais elevada do que nas plantas não inoculadas, 72 HAI (Figura 23D).

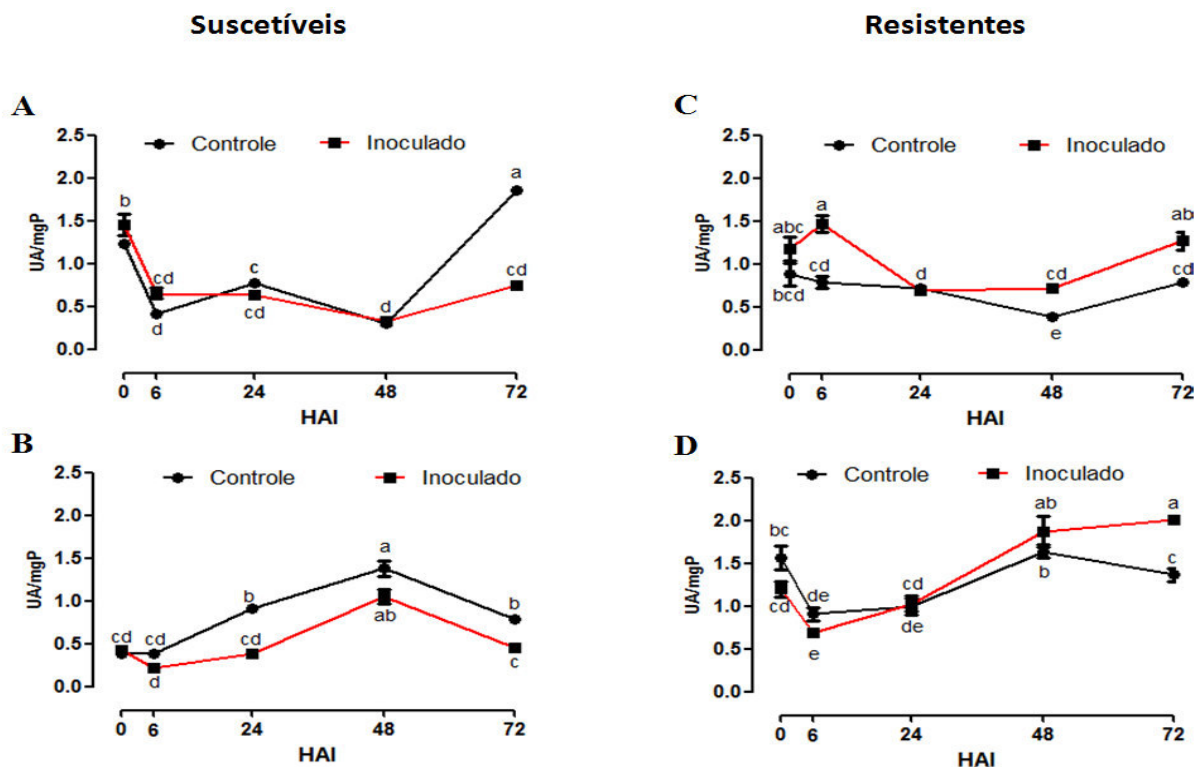


Figura 23. Atividade enzimática de polifenol oxidase (PPO), em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e BRS marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

3.3. Teor de compostos fenólicos

Como uma tendência, mais baixos teores de compostos fenólicos foram observados nos genótipos de feijão-de-corda suscetível ao CPSMV, BRS pujante e CE-31, quando inoculados com o CPSMV, em relação aos seus respectivos controles, sendo mais proeminente no primeiro. De fato, no BRS pujante, os teores de fenóis se apresentaram 39,9 e 38,9% menores nas plantas desafiadas com o vírus em relação às controles, 24 e 72 HAI, respectivamente (Figura 24A). No outro genótipo suscetível, CE-31, o conteúdo de fenol nas plantas inoculadas com o vírus foi 30,3% menor comparando com as plantas controles em 72 HAI (Figura 24B). O genótipo resistente, BRS rouxinol, inoculado com o patógeno, apresentou aumento de 43,1% no conteúdo de fenol, mas apenas 72 HAI, em relação às plantas controles (Figura 24C). Já no outro genótipo resistente, BRS marataoã, embora os teores de fenóis tenham mostrado tendência crescente bastante significativa, ao longo do

período experimental, não foram encontradas diferenças significativas entre plantas desafiadas com o vírus em estudo e controles (Figura 24D).

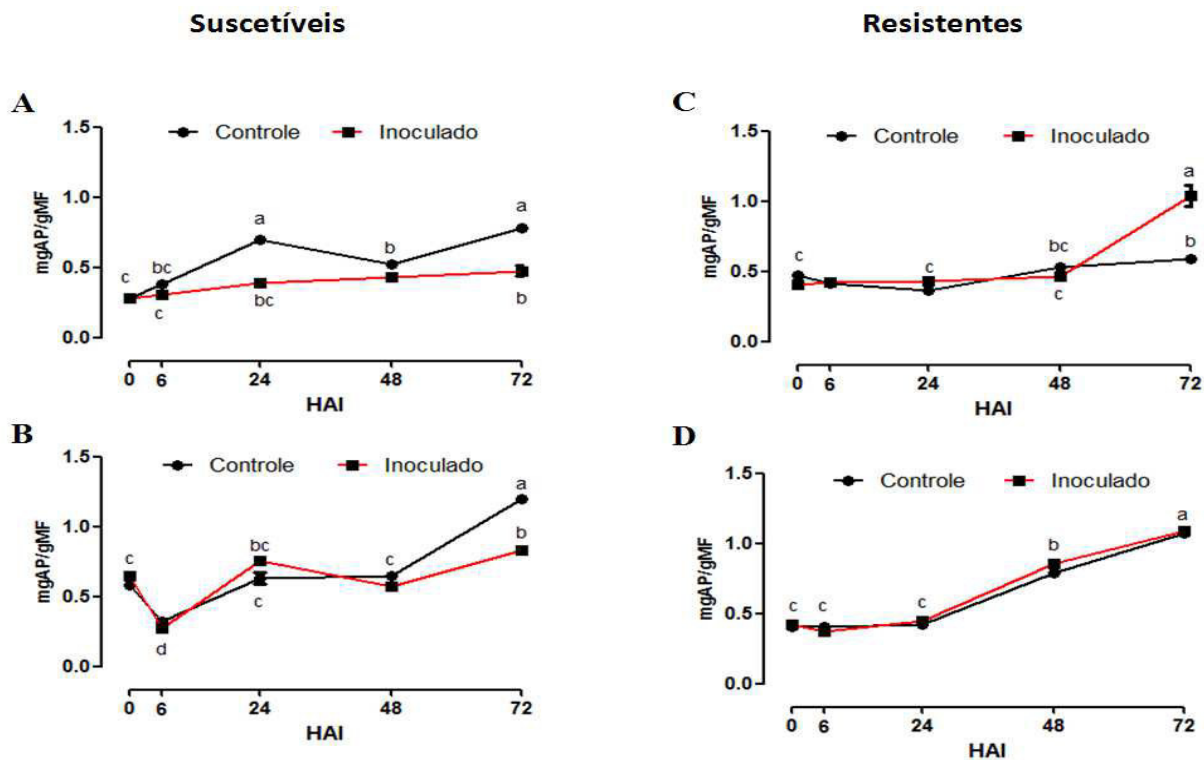


Figura 24. Conteúdo de fenóis totais, em folhas secundárias de feijão-de-corda, controle e inoculado com o CPSMV. Genótipos suscetíveis: BRS pujante (A) e CE-31 (B). Genótipos resistentes: BRS rouxinol (C) e marataoã (D). Letras diferentes nos tempos analisados, em cada curva, indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre plantas inoculadas com o vírus e plantas controles.

4. DISCUSSÃO

4.1. Atividade da PAL

A fenilalanina amônia liase (PAL) é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas devido sua importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos, estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos. Essa enzima é responsável pela desaminação não oxidativa da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico, que pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os

quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (Gerasimova et al., 2005; Stangarlin et al., 2010).

Correlacionando as atividades da PAL entre os genótipos suscetíveis (BRS pujante e CE-31) e os resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) ao CPSMV (Fig 21), plantas inoculadas dos genótipos suscetíveis mostraram tendência de decréscimo da atividade dessa enzima ao longo do período após inoculação com o vírus, comparando com as plantas controles. Essa tendência pode levar a uma menor produção de compostos fenólicos, já que a inibição da PAL afeta as vias biossintéticas desses compostos (Jayaraj *et al.* 2010). Ao contrário, nos genótipos resistentes, houve aumento ou manutenção da atividade da PAL nas plantas inoculadas, em comparação com as respectivas plantas controles. Essas diferenças nas cinéticas da atividade da PAL e os relatos existentes na literatura sugerem associação dessa enzima com a resistência dos genótipos BRS rouxinol e BRS marataoã à infecção viral pelo CPSMV, como em outros trabalhos. Por exemplo, plantas de tabaco com genes da PAL silenciados apresentaram aumento de suscetibilidade ao vírus em comparação com plantas controles, demonstrando déficit na formação de ácido salicílico (Pallas *et al.*, 1996) Em outro trabalho realizado com o patossistema tabaco-TMV, foi verificada aumento da expressão gênica da PAL após infecção com vírus e consequente aumento de ácido salicílico (Ogawa *et al.* 2006). Pesquisas realizadas com genótipos de soja suscetíveis e resistentes à ferrugem-asiática-da-soja mostraram que os genótipos resistentes não apresentaram diminuição da atividade da PAL (Hebréia *et al.*, 2012).

4.2. Atividade da POX e PPO

A POX é uma das primeiras enzimas que respondem fornecendo defesa rápida contra patógenos de plantas (Sulman et al. 2001) e está envolvida em diversas reações como ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células e outras (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Kuo & Kao, 2003; Maksimov *et al.* 2014).

A importância da atividade da PPO deve-se, provavelmente, à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, as quais são muito mais tóxicas aos microrganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento. Por esta razão, admite-se que um aumento na atividade de PPO resulta em altas concentrações de

produtos tóxicos de oxidação e, portanto, maior grau de resistência à infecção (Agrios, 2005; Zheng-Cuiming *et al.*, 1999). Muitos estudos têm identificado como papel de PPO a polimerização de monolignóis em olignóis, molécula precursora da lignina (Lax & Cary, 1995)

As atividades de enzimas oxidativas como POX e PPO têm sido bastante estudadas em plantas, como parte dos mecanismos de defesas induzidas, ou em condições de estresse (Sánchez *et al.*, 2000; Nojosa *et al.*, 2003).

Comparando a atividade de POX entre os genótipos suscetíveis (BRS pujante e CE-31) e os resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) ao CPSMV (Fig. 22), as plantas inoculadas dos genótipos suscetíveis demonstraram tendências de atividades mais baixas, em relação às plantas controles, especialmente a partir de 24 HAI. Por outro lado, o genótipo resistente BRS rouxinol apresentou atividades crescentes da POX nas plantas inoculadas, bem como o BRS marataoã, embora esse último com valores equivalentes aos encontrados nas plantas controles não inoculadas com o CPSMV.

Correlacionando as atividades de PPO entre os genótipos suscetíveis (BRS pujante e CE-31) e os resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) ao CPSMV (Fig. 23), as plantas suscetíveis inoculadas com o vírus apresentaram atividades iguais ou menores, em comparação com as suas respectivas plantas controles. Por outro lado, nos genótipos resistentes a atividade de PPO foi igual ou maior em plantas inoculadas, em comparação com suas respectivas plantas controles.

Estudos correlacionam maior atividade de POX e PPO com maior resistência de plantas ao ataque de patógenos. Mudanças na atividade dessas enzimas têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (Viecelli *et al.*, 2010). Segundo Mydlarz & Harvell (2006), a infecção de plantas com patógenos induzem aumento da atividade de POX, sendo o maior aumento registrado em plantas resistentes, comparando-as com plantas suscetíveis

Resultados similares aos encontrados neste trabalho, foram relatados em pesquisas realizadas com plantas suscetíveis e resistentes ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) e ao vírus do mosaico do tomate (ToMV), nos quais houve aumento de atividade de POX em todas as plantas inoculadas com TMV e ToMV, sendo as maiores atividades detectadas em plantas resistentes aos vírus (Madhusudhan *et al.*, 2009). Em outro trabalho, genótipos de algodão suscetíveis e resistentes ao *Cotton Leaf Curl Burewala virus* (CLCuBuV) apresentaram diferenças na atividade de POX e, principalmente, na atividade de PPO, em que

os genótipos suscetíveis apresentavam atividades menores dessas enzimas em relação às plantas dos genótipos resistentes, comparando plantas infectadas com plantas saudáveis (Zeeshan Sidique *et al.*, 2014).

4.3. Teor de compostos fenólicos

As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos estão muito bem estudadas. As vias do ácido shiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (Schwan-Estrada *et al.*, 2008). Compostos fenólicos são bem conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (Lo & Nicholson, 1992).

Correlacionando os resultados obtidos nesse presente estudo, os genótipos suscetíveis (BRS pujante e CE-31) registraram valores iguais ou menores do conteúdo de fenóis, nas plantas inoculadas em comparação com as plantas controles, enquanto os genótipos resistentes (BRS rouxinol e BRS marataoã) apresentaram valores iguais ou maiores. Esses resultados são consistentes com as atividades da PAL, POX e PPO. Pois a não redução da atividade da PAL associada com a crescente atividade da POX e PPO, sugerem que a via de síntese de compostos fenólicos não foram inibidas, proporcionando uma melhor resposta de defesa dos genótipos resistentes à infecção provocada pelo CPSMV.

Resultados similares ao desse presente estudo foram encontrados por Arpita Chattergee & Subrata K. Gosh (2008) em plantas *Hibiscus cannabinus* e *Hibiscus sabdariffa* L suscetíveis ao *Mesta yellow vein mosaic virus*, neste trabalho, baixo conteúdo de compostos fenólicos foi encontrado nas plantas infectadas em relação às não infectadas associando tal resultado com a suscetibilidade da planta. Foram relatados, também, resultados similares em estudos realizados com diferentes genótipos de aveia inoculados com *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae*, em tal pesquisa verificou-se um rápido acúmulo de compostos fenólicos no genótipo resistente, o mesmo não aconteceu com o genótipo suscetível, esse resultado foi associado ao mecanismo de resistência da planta à infecção causada pelo *Puccinia coronata* Corda f. sp. *avenae* (Figueiró *et al.*, 2015). Essa pesquisa encontra suporte, também, no trabalho com genótipos de algodoeiro suscetíveis e resistentes ao *Cotton Leaf Curl Burewala virus* (CLCuBuV), em que dados referentes ao conteúdo de compostos fenólicos, atividades de PAL, POX e PPO são observados constitutivamente ou indutivamente superiores nos genótipos resistentes, enquanto os genótipos suscetíveis demonstram baixos conteúdo de

compostos fenólicos, atividades de PAL, POX e PPO prejudicadas, sendo esses dados associados ao mecanismo de resistência das plantas à infecção viral.

CONSIDERAÇÕES GERAIS FINAIS

Os resultados aqui apresentados permitem confirmar o envolvimento de SOD, CAT, APX, PAL, POX e PPO, bem como do O_2^- , H_2O_2 e compostos fenólicos no mecanismo de resistência dos genótipos de feijão-de-corda, BRS rouxinol e BRS Marataoã, ao CPSMV. Aparentemente, há uma articulação integrada e complexa dessas moléculas na defesa do feijão-de-corda à infecção pelo CPSMV, definindo os fenótipos de suscetibilidade e resistência para essa cultura. Essa afirmação pode ser mais bem visualizada no esquema da Figura 25.

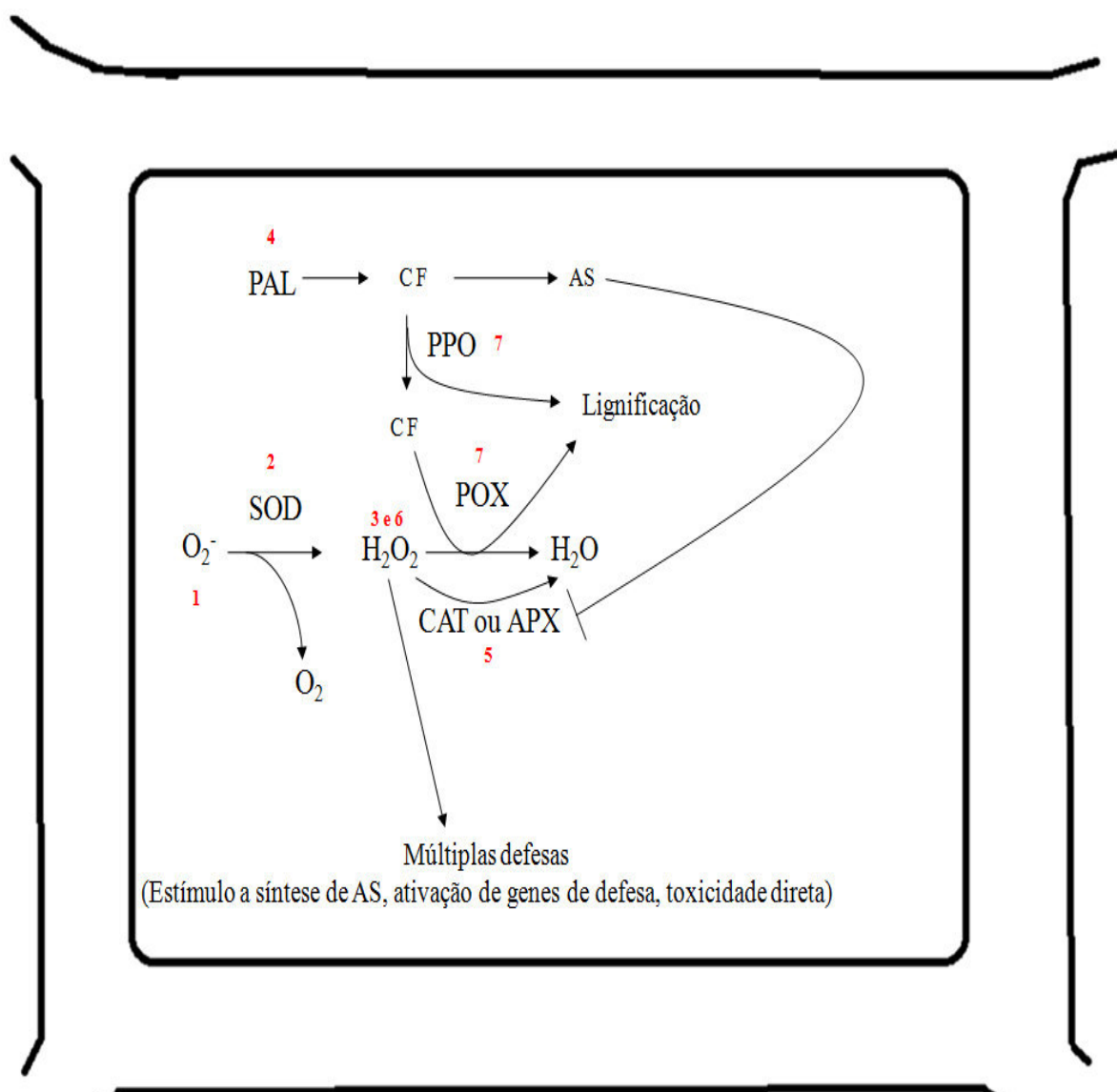


Figura 25. Possíveis eventos envolvidos na resistência de genótipos de feijão-de-corda ao CPSMV. CF – Compostos fenólicos; AS – Ácido salicílico.

Possíveis alterações bioquímicas que caracterizam a suscetibilidade e resistência do feijão-de-corda ao vírus do mosaico severo do caupi:

- Genótipos resistentes: ao serem infectados com CPSMV os genótipos resistentes **(1)** aumentam rapidamente o nível de superóxido O_2^- ; em seguida **(2)** a atividade da SOD aumenta, para eliminar os efeitos danosos causados por O_2^- com conseqüente **(3)** produção de H_2O_2 , que atuará como substrato para POX, estímulo a formação de ácido salicílico, ativação de genes de defesa; **(4)** a atividade da PAL aumenta para síntese de compostos fenólicos, que serão substratos da POX e PPO e serão transformados em ácido salicílico; **(5)** o acúmulo de ácido salicílico inibe a atividade da CAT/APX, **(6)** proporcionando que o H_2O_2 não seja removido permitindo que o mesmo continue atuando como substratos da POX, no estímulo de genes de defesa. **(7)** A atividade da POX e PPO aumenta favorecendo uma maior lignificação da parede celular.

- Genótipos suscetíveis: ao serem infectados pelo CPSMV os genótipos suscetíveis **(1)** não alteram o conteúdo de superóxido O_2^- ; a atividade da SOD também não se altera **(2)**; o conteúdo de H_2O_2 permanece inalterado ou baixa **(3)** proporcionando baixo nível de substrato para a POX, pouco estímulo a formação de ácido salicílico, não ativação de genes de defesa; **(4)** a atividade da PAL é inibida fornecendo menos compostos fenólicos para atuarem como substratos da POX e PPO, ou serem transformados em ácido salicílico; **(5)** o baixo nível de ácido salicílico não inibe a atuação da CAT/APX permitindo a **(6)** remoção de H_2O_2 impedindo o acionamento das defesas da planta. **(7)** A PPO demonstra um déficit de atividade, pois a produção de compostos fenólicos é baixa; a atividade da POX é diminuída devido o baixo nível de H_2O_2 e compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. 2005. *Plant Pathology* (5th edition). Elsevier Academic Press. San Diego, CA. 922 pp.

ALVAREZ, M.E., PENNELL, R.I., MEIJER, P. J., ISHIKAWA, A., DIXON, R.A. & LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92:1-20. 1998.

ANDRADE, C. A. *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v.55, p. 373–99, 2004.

ARPITA CHATTERJEE - SUBRATA K. GHOSH - *Brazilian Journal of Plant Physiology* - Vol. 20 - Issue 4 - 2008

ASADA, K.. Production and scavenging reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology, Rockville*, v. 141, p. 391-396, 2006.

ASSUNÇÃO, I. P. *et al.*, Genes diferentes podem conferir resistência ao cowpea severe mosaic vírus em caupi. *Fitopatologia Brasileira*, v.30, n. 3, p. 274 – 278, 2005.

ATHAYDE SOBRINHO, C; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M.J. (Org.). *A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil*. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. p.120-145.

BARRETO, P.D. Recursos genéticos e programa de melhoramento de feijão-de-corda no Ceará: Avanços e perspectivas. In: QUEIRÓS, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.) *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro*. EMBRAPA, CPATSA, Petrolina. 1999.

BARRADAS, M. M.; SALAS, F. J. S.; BUITRÓN, I. G.; OLIVEIRA, J. M. Morfologia e transmissão de vírus isolado de *Vigna luteola*. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 4., Campinas, 1991. Anais... Campinas: Estação Experimental do Instituto Biológico, 1991. P. 13.

BHATTACHARJEE, S. The language of reactive oxygen species signaling in plants. *Journal of Botany*, London, v.12, p.1-22, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle for protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248 – 254, 1976.

BRADSHAW, J. D.; et al. Landscape epidemiology of *Bean pod mottle* Comovirus: molecular evidence of heterogenous sources. *Arch. Virol.*, v. 156, p. 1615 – 1619, 2011.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. *Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal*. Cordoba. v. 2, n. 2. Mar. 2005. Disponível em: <<http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>>. Acesso em: 09 Jul. 2015.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-962, Sept. 1999.

COELHO, R. S. B., PIO-RIBEIRO, G. & ANDRADE, G. P. Controle genético da resistência em linhagem genética em caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) ao vírus do mosaico severo do caupi.. 310 CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Fortaleza, CE. 1998. Resumos, 1998. p. 315.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: levantamento. Brasília. 39p. 2012

COOPER, J. I.; JONES, A. T. Responses of plants to viruses: proposals for use of terms. *Phytopathology*, St. Paul, v. 73, p. 127-128, 1983.

COSTA, C. L., *Cerotoma arcuata* (Oliv.) um crisomelídeo vetor do mosaico da Vigna no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 3, p. 81 – 82, 1978.

DAVAR, R., DARVISHZADEH, R., MAJD, A., 2013. Changes in antioxidant systems in sun flower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biol* 68, 821 – 829

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, v. 141, p. 330–335, 2006.

DOKE, N. & OHASHI, Y . Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32:163-175. 1988.

DOKE, N. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology* 23:359-367. 1983.

DOKE, N.; MIURA, Y.; SANCHEZ, L. M.; PARK, H.-J.; NORITAKE, T.; YOSHIOKA, H.; KWAKITA, K. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence – a review. *Gene*, v.179, p.45-51, 1996.

DURNER J, KLESSIG DF (1995) Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 11312- 11316

EHSANI-MOGHADDAM B, CHARLES MT, CARISSE O, KHANIZADEH S. 2006. Superoxide dismutase responses of strawberry cultivars to infection by *Mycosphaerella fragariae*. *J Plant Physiol.* 163:147–153.

ELSTNER, E. F, HEUPEL A (1976). Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal. Biochem.* 70: 616-620.

FAO. Agricultural production: primary crops. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 22 dez. 2009.

FERNANDES, C. F. Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. 2004. 162f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FIGUEIRÓ, A. A. *et al.* Análise do transcriptoma da cultivar de aveia URS 21, parcialmente resistente à ferrugem da folha, na interação *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. In: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 33, 2013, Pelotas.

FREIRE FILHO, F.R. Desenvolvimento, seleção e difusão de germoplasma de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.): relatório final. Teresina Meio-Norte, 1999. 1v.(Embrapa.) Programa 4. Sistema de Produção de grãos. Projeto (04.0.99.543). Projeto concluído.

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E. E. (Org.). O caupi no Brasil. Brasília, DF: IITA: EMBRAPA, 1988. p. 26-46.

GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 52, p. 154-161, 2012.

GAY, C., COLLINS, J., GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry*, v. 273, p. 149-155, 1999.

GERASIMOVA, N. G; PRIDVOROVA, S.M.; OZERETSKOVSKAYA, O.L. Role of L-phenylalanine ammonia-lyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.41, p.103-105, 2005.

GRZELA, R., STROKOVSCA, L., ANDRIEU, J. P., DUBLET, B., ZAGORSKI, W., CHROBOCZEK, J. Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie*. v. 88, 887 – 896. 2006

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 909-930, 2010.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, Collingwood, v. 32, n. 32, p. 481-494, 2005.

GUILLAUME HENRY, PHILIPPE THONART & MARC ONGENA, «PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors», *Base* [En ligne], volume 16 (2012), numéro 2, 257-268 URL : <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=8709>.

GULSEN, O.; EICKHOFF, T.; HENG-MOSS, T.; SHEARMAN, R.; BAXENDALE,; SARATH, G.; LEE, D. Characterization of peroxidase changes in resistant and susceptible warm-season turf grasses challenged by *Blissus occiduus*. *Arthropod Plant Interact*, v. 4, p. 45-55, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. Clarendon Press: Oxford, 2006.

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

HAMMOND-KOSACK, K.E. AND JONES JDG (2000) Responses to Plant Pathogens In “ Biochemistry and Molecular Biology of Plants” p 1102- 1156 Ed BB Buchanan, W Gruissem and RL Jones. Pp1367 (1st Edition) *American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA.*

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 1987 Jun;84(2):450–455.

HEBRÉIA et al., Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, n.2, p.163-172, fev. 2012

HELLEMANS., J; MORTIER., G; DE PAEPE., A; SPELEMAN., F & VANDESOMPELE., J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8:R19, 2007.

HOANGLAND, D. R., ARBIB, D. I. The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station of University of California, Berkeley, v. 347, p. 139, 1950.

HULL R (2009). Effects on plant metabolism, 181-185 p. In: Comparative plant virology, 2nd ed. *Academic Press*, Nor-wich.

JAYARAJ J, BHUVANESWARI R, RABINDRAN R, MUTHUKRISHNAN S, VELAZHAHAN R. 2010. Oxalic acid-induced resistance to *Rhizoctonia solani* in rice is associated with induction of phenolics, peroxidase and pathogenesis-related proteins. *J Plant Interact.* 5:147–157.

JIANG M, ZHANG J. 2001. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 42,1265–1273.

JIMENEZ, C.C.M., BORGES, O.L. & DEBBROT, E.A. Herancia de la resistencia del frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) al virus del mosaic severo del caupi. *Fitopatologia Venezuelana* 2:5-9. 1989.

JONES, J.D.G, DANGL. J. L; 2006. The plant immune system. *Nature*. 444:323–329

KAREEM, K. T.; TAIWO, M. A. Interaction of viruses in cowpea: effect on growth and yield parameters. *Virology Journal*, v. 4, p. 15, 2007

KUO MC, KAO CH (2003) Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol. Plant*. 46:149-152.

LAX AR, CARY JW (1995) Biology and molecular biology of polyphenol oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 9:121-128.

LIMA, J. A. A.; *et al.*, *Crotalaria paulineia*, novo hospedeiro natural do vírus mosaico severo do caupi. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 4, p. 429 – 433, 2005a.

LIMA, J. A. A.; *et al.*, Simple and multiple resistances to viruses in cowpea genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.11, p.1432-1438, nov. 2011

LIMA, I. A.; SANTOS, A. A. Vírus que infectam o caupi no Brasil. In: ARAÚJO, IP.P.; WATT, E.E. O caupi no Brasil. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1988. p509.

LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; RIOS, G.P. Serological identification of several cowpea viruses in central Brazil, *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p.73-85, 1981a.

LIN, M.T.; SANTOS, A.A.; MUNOZ, J.O.; Ocorrência de vírus do Mosaico do Pepino, no estado do Piauí. In: I reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, 1982, Teresina. Resumos. Goiânia: Embrapa-CPAMF, 1982 p. 101-102.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods* 25: 402–408.

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v.49, p.21-31, 1996.

MADHUSUDHAN KN, SRIKANTA BM, SHYLAJA MD, PRAKASH HS, SHETTY HS. 2009. Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host tobamovirus interaction. *J Plant Interact*. 4:157–166

MAKSIMOV I, TROSHINA N, SURINA O, CHEREPANOVA E. 2014. Salicylic acid increases the defense reaction against bunt and smut pathogens in wheat calli. *J Plant Interact*. 9:306–314

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v.7, p.405-410, 2002.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:561-91. 2001.

MORI I. C., PINONTOAN R., KAWANO T., MUTO S. (2001). Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol*. 42 1383–1388 10.1093/pcp/pce176

MOZZETTI, C.; FERRARIS, L.; TAMIETTI, G.; MATTA, A. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora* - pepper interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.46, p.95-107, 1995.

MYDLARZ, L.D., L.E. JONES AND C. D. HARVELL. 2006. Innate Immunity, Environmental Drivers and Disease Ecology of Marine and Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, Vol 37, pp 251-288

NASCIMENTO, J. B; BARRIGOSSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. *Agrarian Academy*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.1, n.01; p. 2014

NGADZE E, ICISHAHAYO D, COUTINHO TA, VAN DER WAALS J E. 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phe-nols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Dis.* 96:186–192

NOGUEIRA, M. S. R, *et al.* Avaliação da Reação de Genótipos de Feijão-caupi a Infecção por Vírus por Meio dos Efeitos Qualitativos: Embrapa Meio-Norte. Teresina-PI. 2010.

NOJOSA, G. B. A. Efeito de indutores na resistência de *Coffea arábica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. e *Phoma costarricensis* ECHANDI. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

OGAWA D, NAKAJIMA N, SEO S, MITSUHARA I, KAMADA H, OACI Y. 2006. The phenylalanine pathway is the main route of salicylic acid biosynthesis in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Plant Biotechnol.* 23:395–398.

OLIVEIRA, M.A. Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar (*Vigna spp*). Instituto Agronômico do Sul (Pelotas). Boletim Técnico 1:1-36. 1947.

OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLU. I.; KOCACALISKAN.; SAKIROGLO, H. Polyphenoloxidase from Amasya Apple. *Jornal of Food Science*, v.60, n. 3, p 494-505, 1995.

OMONGO, C. A., ADIPALA, E. OGENGA-LATIGO, M. W. AND KYAMANYWA, S. 1998. Insecticide application to reduce pest infestation and damage on cowpeas in Uganda. *African Plant Protection* 4:91-100.

OROZCO-CÁRDENAS MARTHA ML, RYAN C. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999

PALLAS JA, PAIVA LN, LAMB C, DIXON AR (1996) Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase expression do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant J*10:281–293

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B.; MOHAN RAJ, D. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L. E. N. (Ed.). *Advances in cowpea research*. Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture; Tsukuba: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1997. p. 1-12. *Trabalhos selecionados do Second World Cowpea Research Conference, 1995, Accra, Ghana*.

PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 2:1- 51. 1994.

PATEL P K, HEMANTARANJAN A, SARMA B K AND SINGH R (2011) Growth and antioxidant system under drought stress in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as sustained by salicylic acid. *J Stress Physiol Biochem* 7: 130-144.

PAZ, C. D.; et al.. Purificação de um isolado do vírus do mosaico severo da caupi, obtido em Pernambuco, produção de antissoros e determinação de fontes de resistência em caupi. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 185 – 188, 1999.

PELLETIER I. et al., 2002. Study by infrared spectroscopy of ultrathin films of behenic acid methyl ester on solid substrates and at the air/water interface. *J. Phys. Chem. B.*, **106**, 1968-1976.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANA, R.; MOSQUIM, P.R.; OREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.11, p.137-143, 199

PERES, L. E. P; *Metabolismo secundário das plantas*. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. 2015.

PHILLIPS R. D. et al. Utilization of cowpeas for human food. *Field Crops Research*, v. 82, p. 193 – 213, 2003.

PIACHAM,T., ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C., PRACHAYASITTIKUL, V., BÜLOW, L. AND YE, L (2003). A polymer supported manganese catalyst useful as a superoxide dismutase mimic. *Chem. Commun.* 11:1254-1255.

PINTO, A. A. B. P. Cultivares de bata resistentes a viroses. *Batata show*, Itapetinga, v.3, n. 7, p.11, jul. 2003.

PIO-RIBEIRO, G. and ASSIS F.M.. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: KIMARI, H., AMORIM, L., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M.(Eds.) *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres. 1997. pp. 233-244.

PONTE, J. J. Subsídios à utilização da manipueira como nematicida: dosagem e interferência na fertilidade do solo. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 12, n. 1, p. 35-45, 1988

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, p.123-130, 2003. DOI: 10.1590/ S0100-41582003000200001.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*. v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIEDLE-BAUER, M. Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in Systemic Virus Infections of Plants. *Journal of Phytopathology*, v.148, p.297- 302, 2000

RIOS, G.P.; NEVES, B.P.. 1989. Dispersão do vírus do mosaico severo do caupi.. *Fitopatologia Brasileira*, v.9 p. 20-25.

RIOS, G. P. Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.). *O caupi no Brasil*. Brasília: IITA, EMBRAPA, 1988. p.549-589.

RIOS, G.R. Resistência ao Vírus do Mosaico Severo do Caupi, *Fitopatologia Brasileira*, v.9, p.309, 1984.

ROCHA, M.M.; LIMA, J.A.A.; FREIRE FILHO, F.R.; ROSAL, C.J.S.; LOPES, A.C.A. Resistência de genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) de tegumento branco a isolados de vírus das famílias Bromoviridae, Comoviridae e Potyviridae. *Ciência Rural*, v.8, p.85-92, 2003.

SALAZAR SM, CASTAGNARO AP, ARIAS ME, CHALFOUN N, TONELLO U, DÍAZ RICCI JC. 2006. Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *Eur J Plant Pathol* 117: 109–122

SÁNCHEZ, E., SOTO, J.M., GARCIA, P.C., LÓPEZ-LEFEBRE, L.R., RIVERO, R.M., RUIZ, J.M. & ROMERO, L. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:973-978. 2000.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M. ;MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany, Oxford*, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

SILVA, R. A. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2008. 40 p

SINGH BB (2002) Recent genetic studies in cowpea. In: Fatokun CA, Tarawali SA, Singh BB, Kormawa PM, Tamo M (eds) *Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea Production*. Intl Inst Tropical Agric, Ibadan, Nigeria, pp. 3–13

SPOUSTOVÁ, P.; HÝSKOVÁ, V.; MÜLLER, K.; SCHNABLOVÁ, R.; RYŠLAVÁ, H.; ČEŘOVSKÁ, N.; MALBECK, J.; CVIKROVÁ, M.; SYNKOVÁ, H. Tobacco susceptibility to Potato virus YNTN infection is affected by grafting and endogenous cytokinin content. *Plant Science* 2015, 235, 25.

SULMAN M, FOX G, OSMAN A, INKERMAN A, WILLIAMS P, MICHALOWITZ M. 2001. Relationship between total perox-oxidase activity and susceptibility to black point in mature grain of some barley cultivars. Proceeding of the 10th Australian Barley Technical Symposium. Canberra, ACT, Australia, 16–20 Sep. 2001.

TANAKA Y, KOJIMA M, URITANI I (1974) Properties, development and cellular localization of cinnamic acid 4-hydroxylase in cut- injured sweet potato. *Plant Cell Physiol* 15: 843-854.

TOMPSON, V. S. Studies on resistance to cowpea mosaic virus in selected varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). M. Sc. Thesis. The Library, The University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad. 1977.

THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H.W. Worldwide occurrence and distribution of virus diseases . In: Cowpea Research, Production and Utilization, SINGH, S.R. & RACHIE, K.O. p. 155-171, 1985.

THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H.W. Viruses diseases of cowpea in tropical Africa. *Tropical Pest Management*, v.38, p. 337-348. 1992.

UMAHARAN, P.; ARIYANAYAGAN, R. P.; HAQUE, S. Q. Resistance to cowpea severe mosaic virus,determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata*(L.) Walp. *Euphytica*, v. 95, p. 49-55, 1996

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

VANDESOMPELE, J., De PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., De PAEPE, A. & SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:7, 2002.

VAN HOFF, H. A. Overbrenging van het *Cowpea mosaic virus* in Suriname. De Suriname Landbouw, v. 11, p. 131 – 137, 1963.

VANITHA SC, NIRANJANA SR, UMESHA S. 2009. Role of phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase in host Z. Siddique et al. 710 Downloaded by [200.19.186.24] at 10:57 26 January 2015 resistance to bacterial wilt of tomato. *J Phytopathol.* 157:552–557.

VANITHA SC, UMESHA S. 2008. Variations in defense related enzyme activities in tomato during the infection with bacterial wilt pathogen. *J Plant Interact.* 3:245–253.

VIECELLI, C.A.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Indução de resistência em feijoeiro à mancha angular por extratos de micélio de *Pycnopus sanguineus*. *Summa Phytopathologica*, v.36, p.73-80, 2010.

WALTERS D, NEWTON A, LYON G (2007) *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*. Blackwell, Oxford

WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMAH. C. Defensive responses in groundnut against chewing and sap-sucking insects. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 32, p. 259-272, 2013.

WATT, E. E.; KUENEMAN, E. A.; ARAUJO, J. P. P. de. Achievements in breeding cowpeas in Latin American. In: S. R. Singh & K. O. Rachie (Eds.), **Cowpea: research Production and Utilization**. New York: John Wiley and Sons, 1985, p. 125 – 128.

WLADIMIR, G. M. Prospecção bioquímica e molecular de fatores possivelmente envolvidos na defesa de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) ao vírus do mosaico severo do caupi. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

WOHLGEMUTH H, MITTELSTRASS K, KSCHIESCHAN S, BENDER J, WEIGEL HJ, OVERMYER K, KANGASJÄRVI J, SANDERMANNH, LANGEBARTELS C. 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environ*25: 717–726.

YOSHIDA K, KAOTHIEN P, MATSUI T, KAWAOKA A, SHINMYO A. 2003. Molecular biology and application of plant perox- idase genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:665–670.
Zhao CJ, Wang AR, Shi YJ, Wang LQ, Liu WD, Wang ZH,

YOSHIMURA K, YABUTA Y, ISHIKAWA T, SHIGEOKA S. 2000. Expression of ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123: 223–233.

ZEESHAN SIDDIQUE, KHALID PERVAIZ AKHTAR, AMJAD HAMEED, NIGHAT SARWAR, IMRAN-UL-HAQ & SAJID ALEEM KHAN, 2014. Biochemical alterations in leaves of resistant and susceptible cotton genotypes infected systemically by cotton leaf curl Burewala virus. *Journal of Plant Interactions*, 9:1, 702-711

ZHAO, H. et al.2005. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. *Colloids and Surfacer B: Biointerfaces*, 44:36-40

ZHAO CJ, WANG AR, SHI YJ, WANG LQ, LIU WD, WANG ZH, LU GD. 2008. Identification of defense-related genes in rice responding to challenge by *Rhizoctonia solani*. *Theor Appl Genet.* 116:501–516.

ZHENG-CUIMING, TENG-BING, GAO-FENGI, WUZONGPU, ZHENG-C.M., TENG-B., GAO-F.L., WU-Z.P. 1999. Studies on the changes of superoxido dismutase, peroxidase and poliphenol oxidase in seed coat of soybeans after infection with soybean mosaic virus. *Sci. Agricult. Sinica* 32, 99-101.

ZERAIK. A. E; SOUZA, S. F; FILHO. O. F; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. vol.31 no.4 São Paulo 2008

ZERBINI JR., F.M.; DE CARVALHO, M.G. & ZAMBOLIM, E.M. Introdução à virologia vegetal. 1ª ed. Editora UFV. Viçosa. 2002.