

IZABELLE TAYNÃ DOURADO DE SIQUEIRA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.)  
UTILIZANDO ACIBENZOLAR-S-METIL NO CONTROLE DA ANTRACNOSE**

GARANHUNS - PERNAMBUCO - BRASIL

FEVEREIRO – 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.)**  
**UTILIZANDO ACIBENZOLAR-S-METIL NO CONTROLE DA ANTRACNOSE**

**IZABELLE TAYNÃ DOURADO DE SIQUEIRA**

**SOB ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA**  
**KEILA APARECIDA MOREIRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências da Pós Graduação em Produção agrícola, para obtenção do título de Mestre.

**GARANHUNS - PERNAMBUCO - BRASIL**  
**FEVEREIRO - 2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Setorial - UAG, Garanhuns-PE, Brasil

S618i Siqueira, Izabelle Taynã Dourado de  
Indução de resistência em feijão caupi (*vigna unguiculata*  
(l.) walp.) utilizando acibenzolar-s-metil no controle da  
antracnose/Izabelle Taynã Dourado de Siqueira.- Garanhuns,  
2017.  
43 f. : il.  
Orientador: Keila Aparecida Moreira  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Agrícola,  
Garanhuns, BR-PE, 2017.  
Inclui referências.

1. Cultura do feijão 2. Controle Qualidade 3. Controle da  
antracnose 4. Estudos qualitativos I. Moreira, Keila Aparecida I.  
Título.

CDD 635.652

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA**

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.)**  
**UTILIZANDO ACIBENZOLAR-S-METIL NO CONTROLE DA ANTRACNOSE**

**IZABELLE TAYNÃ DOURADO DE SIQUEIRA**

GARANHUNS- PE  
FEVEREIRO – 2015

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.)  
UTILIZANDO ACIBENZOLAR-S-METIL NO CONTROLE DA ANTRACNOSE**

IZABELLE TAYNÃ DOURADO DE SIQUEIRA

APROVADO EM: 24 DE FEVEREIRO DE 2015



---

**LIDIANE ROBERTA CRUZ DA  
SILVA**  
Membro externo



---

**MÁCIO FARIAS DE MOURA**  
Membro interno – UAG-UFRPE



---

**KEILA APARECIDA MOREIRA**  
Orientadora

## Dedicatória

*Primeiramente aos meus pais por me darem todas as oportunidades e me apoiarem ao longo de todo o meu percurso acadêmico.*

*Às minhas irmãs Vitória Dourado, Virgínia Dourado e Tamiris Dourado por todo carinho dedicado em todos os momentos de tristeza e alegria em minha vida e por todo apoio oferecido em cada dia que passo.*

*A todos que me ajudaram a crescer, a valorizar-me e a acreditar em mim.*

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço a Deus, pela vida e por estar presente constantemente.

Agradeço a minha família pelo apoio total ao longo de todo o meu percurso.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Keila Aparecida Moreira por todo o apoio demonstrado desde o início, pela orientação e pelas palavras conselheiras. E a colaboração da minha co-orientador a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erika Valente de Medeiros.

A todos os meus colegas do Laboratório de Biotecnologia do CENLAG/UAG. Com carinho aos meus colegas de trabalho Ariele Andrade, Dyana Tenório, Edson Flávio e Jamily Alves que foram de extrema importância nos experimentos de laboratório.

Não poderei esquecer-me de minha grande amiga Jéssyca Dellinhares Lopes Martins, por todos os seus gestos de bondade e humildade, que mesmo distante me inspirou a seguir sempre adiante.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, por fornecer todo apoio estrutural e educacional.

A CAPES, por ter me concedido apoio financeiro imprescindível para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A Pós-Graduação em Produção Agrícola (PPGPA) da Unidade Acadêmica de Garanhuns por fornecer todo apoio estrutural e educacional para realização desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Izabelle Taynã Dourado de Siqueira, filha de José Carlos de Siqueira e Tânia Maria Dourado de Siqueira, nasceu no município de Caetés – PE, em 04 de fevereiro de 1989.

Em 2007 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, na Unidade Acadêmica de Garanhuns, concluindo em janeiro de 2013.

Em 2013 ingressou na Pós-Graduação em Produção Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns UFRPE/UAG em Garanhuns – PE, sob a orientação da professora doutora Keila Aparecida Moreira, defendendo a dissertação em 24 de fevereiro de 2015.



## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	10
GENERAL SUMMARY .....	11
INTRODUÇÃO GERAL .....	12
CAPÍTULO I .....	16
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
2.1. Descrição da área de estudo .....	20
2.2. Obtenção do micro-organismo .....	20
2.3. Produção das plantas em casa de vegetação e aplicação do indutor .....	20
2.4. Obtenção das amostras de tecido foliar .....	21
2.5. Determinações enzimáticas.....	22
2.5.1. Atividade de peroxidase.....	22
2.5.2. Atividade de catalase .....	22
2.5.3. Atividade de polifenoxidase.....	22
2.5.4. Atividade de ascorbato peroxidase .....	23
2.6. Severidade da doença.....	23
2.7. Análise estatística .....	23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
3.1. Peroxidase .....	24
3.2. Catalase .....	25
3.3. Polifenoxidase .....	27
3.4. Ascorbato peroxidase.....	29
3.5. Severidade da doença.....	33
4. CONCLUSÃO .....	35
5. REFERÊNCIAS .....	36

## RESUMO GERAL

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é o alimento básico das populações, exercendo importante função social no suprimento das necessidades nutricionais das pessoas, além de desempenhar papel fundamental na produção agrícola brasileira, particularmente das regiões Norte e Nordeste. A busca por formas de controle de doenças que apresentem redução do uso de agroquímicos e a conscientização da população acerca dos problemas ambientais ganha destaque no cenário agrícola, principalmente o manejo fitossanitário. A antracnose, fitopatologia causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* é uma das doenças mais importantes da cultura do feijão. O uso de produtos comerciais que induzem resistência ganha relevância no controle de doenças de plantas, que é um dos principais meios de se obter altas produtividades nas culturas. Dentre eles, destaca-se o acibenzolar-S-metil que atua em várias espécies vegetais contra uma ampla gama de patógenos, incluindo fungos, vírus e bactérias. Em plantas infectadas há inicialmente o acúmulo de proteínas induzidas após a penetração do patógeno, há formação de estruturas, que apresentam maior ou menor sucesso na defesa da planta. As enzimas peroxidase, polifenoloxidase, catalase e ascorbato peroxidase são exemplos de proteínas relacionadas à patogenicidade. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e a ativação de enzimas relacionadas à patogenicidade.

O estudo foi conduzido em casa de vegetação no município de Garanhuns – PE, e os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial (5x4x3). As plantas receberam os tratamentos da seguinte forma: TRATAMENTO 1 (0,15gL<sup>-1</sup>); TRATAMENTO 2 (0,30gL<sup>-1</sup>); TRATAMENTO 3 (0,45gL<sup>-1</sup>) e TRATAMENTO 4 (0,60gL<sup>-1</sup>) do acibenzolar-S-metil (Syngenta®) e as plantas que receberam somente água foram denominadas como controle. As plantas permaneceram em casa de vegetação durante 35 dias. Quatro dias após a inoculação do micro-organismo a maior dose do indutor de resistência promoveu maior a atividade para ascorbato peroxidase, esta enzima apresentou diferença significativa entre os demais tratamentos. No oitavo dia após a inoculação a dose 0,15gL<sup>-1</sup> aumentou a atividade de ascorbato peroxidase. No décimo segundo dia após a inoculação quando aplicou-se 0,30gL<sup>-1</sup> do indutor de resistência a catalase apresentou a maior atividade enzimática. O índice de severidade da doença no quarto dia após a inoculação foi maior que no controle. Os tratamentos com maiores doses do acibenzolar-S-metil proporcionaram maior atividade enzimática e conseqüentemente maior resistência às plantas de feijão caupi.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum lindemuthianum*, feijão caupi, peroxidase, catalase, polifenoloxidase, ascorbato peroxidase, acibenzolar-S-metil.

## GENERAL SUMMARY

The cowpea (*Vigna unguiculada* (L.) Walp.) is the staple food of the people, playing an important social role in supplying the nutritional needs of people, and play a key role in the Brazilian agricultural production, particularly in the North and Nordeste. A regions search for ways to control diseases that have reduced use of agrochemicals and public awareness about environmental issues is highlighted in the agricultural scenario, especially the control disease. Anthracnose, plant pathology caused by *Colletotrichum lindemuthianum* is one of the most important diseases of the bean crop. The use of commercial products that induce resistance becomes important in the control of plant diseases, which is a major means of obtaining high yields in crops. Among them, there is the acibenzolar-S-methyl which operates in several plant species against a wide range of pathogens, including fungi, viruses and bacteria. In infected plants there initially the accumulation of proteins induced after penetration of the pathogen, there are training facilities, which have more or less success in plant defense. The peroxidase, polyphenol oxidase, catalase and ascorbate peroxidase are examples of proteins related to pathogenicity. The study was conducted in a greenhouse in the city of Garanhuns - PE, and the treatments were arranged in a factorial design (5x4x3). The plants were treated with the treatments as follows: TREATMENT 1 (0.15gL<sup>-1</sup>); TREATMENT 2 (0.30gL<sup>-1</sup>); 3 TREATMENT (0.45gL<sup>-1</sup>) and Treatment 4 (0.60gL<sup>-1</sup>) acibenzolar-S-methyl (Syngenta®) and plants received water only were designated as control. The plants remained in a green house for 35 days. Thus, the study aimed to evaluate the acibenzolar-S-methyl efficiency in cowpea in controlling anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* and activation of enzymes related to pathogenicity. Four days after inoculation of the micro-organism the largest dose of resistance inducer promoted greater activity for pexoridase ascorbate, this enzyme showed significant differences between the other treatments. On the eighth day after inoculation the dose 0.15gL<sup>-1</sup> increased the activity of ascorbate peroxidase. On the twelfth day after inoculation when applied 0.30gL<sup>-1</sup> inducing resistance catalase showed the highest enzymatic activity. O disease severity index on the fourth day after inoculation was higher than in control. Treatment with higher doses of acibenzolar-S-methyl resulted in higher enzyme activity and consequently greater resistance to bean plants cowpea.

**Key words:** *Colletotrichum lindemuthianum*, cowpea, catalase, ascorbate peroxidase, acibenzolar-S-methyl.

## INTRODUÇÃO GERAL

O feijão caupi, feijão-de-corda ou feijão macassar [*Vigna unguiculata*(L.) Walp.] é considerada uma leguminosa de ciclo anual, porte herbáceo, sendo cultivada em toda a região Nordeste do Brasil (MELO et al., 1999). A colheita pode ser realizada quando os grãos estão secos ou ainda verdes, mas isso depende do tipo de mercado consumidor a quem se pretende comercializar o produto (BLANCO et al., 2011).

A cultura apresenta ciclo precoce, pouco exigente em água e se adapta as mais diversas condições de solo. O cultivo do feijão caupi possui papel de destaque na agricultura familiar, principalmente nos aspectos econômico, social e nutricional (FREIRE FILHO, 2005; TEÓFILO et al., 2008), caracterizado por ser uma leguminosa de alto conteúdo proteico, nas quais suas sementes são fontes de aminoácidos, tiamina e niacina, além de fibras dietéticas, por isso é uma boa opção para a melhoria da qualidade de vida, especialmente da população carente no meio rural e urbano (FONSECA et al., 2010).

A produção mundial de feijão caupi em 2011 foi em torno de 5 milhões de toneladas, conforme registros da FAO (2013). Segundo Freire Filho et al. (2011), os principais países exportadores são, Peru, Brasil, Níger, Mali, Burkina Faso, Benin, Chade, Camarões, Myanmar e Tailândia. Já como importadores Freire Filho et al. (2011) destacam Estados Unidos, Canadá, Portugal, Espanha, Grécia, Reino Unido, Bélgica, Argélia, Egito, Nigéria, Gana, Costa do Marfim, Togo, Gabão, Emirados Árabes Unidos, Israel, Índia e Turquia.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* é uma das doenças mais importantes da cultura do feijão. A doença tem sua origem, geralmente, pela utilização de sementes contaminadas ou pela presença de restos culturais infectados, podendo causar grandes perdas de produção (WORDELL FILHO; STADNIK, 2008).

O controle da antracnose depende da combinação de práticas culturais, incluindo uso de sementes livres do patógeno, eliminação de plantas daninhas, rotação de cultura, tratamento químico e uso de cultivares resistentes (SILVA-LOBO et al., 2005).

Na ânsia de se obter grandes produtividades com técnicas práticas de fácil uso e alta eficiência, a utilização dos fungicidas se expandiu rapidamente causando grande impacto ambiental. O controle de doenças em plantas é um dos principais meios de se obter altas produtividades nas culturas. Visto que, deve haver um grande investimento em

pesquisas e desenvolvimento de produtos e técnicas que se destinam a cumprir tal objetivo. Porém, no final do século passado as pesquisas se intensificaram no uso de resistência por parte da planta, não apenas a resistência gênica a partir de genes introduzidos, mas também a resistência induzida, fenômeno que interessou muitos pesquisadores, os quais vislumbraram a defesa latente por parte das plantas cultivadas, a partir de agentes indutores, bióticos ou abióticos, com baixo impacto ambiental, e com a possibilidade de se usar a mesma tecnologia de aplicação utilizada para os fungicidas (KUHN, 2007).

O acibenzolar-S-metil, comercialmente conhecido como BION® é um ativador de plantas e não tem ação direta contra os patógenos. A aplicação é realizada na parte aérea das plantas, ativando seus próprios mecanismos naturais de defesa e aumentando sua resistência às doenças. Devido ao seu modo de ação particular, o produto deve ser aplicado antes da entrada dos patógenos, ou seja, de forma preventiva. O produto é rapidamente absorvido pelos tecidos foliares e se transloca sistematicamente, tanto para as folhas quanto para as raízes, ativando assim a planta de forma generalizada (BRASIL, 2013).

A utilização de produtos que induzem mecanismos de resistência nas plantas constitui como uma alternativa para o manejo integrado dessa doença (ROMEIRO, 2008). Após o desenvolvimento do acibenzolar-S-metil, observou-se um considerável avanço na indução de resistência (SOBRINHO et al., 2005). Além da atividade fungicida desse produto, ele também pode aumentar a capacidade das plantas se defenderem contra outros patógenos (HERMS et al., 2002; VENANCIO et al., 2003).

Em plantas infectadas por micro-organismos potencialmente patogênicos, há primeiro o acúmulo de proteínas que são induzidas pelo ataque do patógeno. Após a penetração do patógeno, há formação de um ou mais tipos de estruturas, que apresentam maior ou menor sucesso na defesa da planta, e podem apresentar poderosa atividade antifúngica. Exemplos bem caracterizados de proteínas relacionadas à patogenicidade incluem as enzimas peroxidase, polifenoloxidase, catalase e ascorbato peroxidase induzidas por patógenos ou produtos químicos exógenos. Após a infecção, pode ocorrer um pronunciado aumento da atividade dessas enzimas que inibe o crescimento dos fungos e libera substâncias que induzem a produção de fitoalexinas pelas plantas (KIM & HWANG, 1994).

A enzima peroxidase, a qual está presente em tecidos de plantas, em certas células animais, em micro-organismos é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância. Em plantas, ela catalisa a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), originando lignina (ISHIGE et al., 1993). O papel desta no processo de defesa além de reforçar a parede celular a partir da formação de lignina, suberina, polissacarídeos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina está no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que apresentam ação antimicrobiana, bem como na sinalização e também na indução de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999).

A catalase é uma enzima indispensável para desintoxicação das células das plantas em condições de estresse, pois ela é responsável pela dismutação direta de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , removendo este peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidos na oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo de purinas. Níveis elevados de  $H_2O_2$  são tóxicos para a planta, enquanto que a concentrações mais baixas desempenha um papel muito importante na transdução de sinal nas plantas atacadas por fungos e insetos (PRASAD et al, 1994). Esta enzima é a principal via de degradação  $H_2O_2$  e, portanto, o aumento na atividade de catalase resulta na ativação da resistência sistêmica adquirida. Este sistema é ativado quando as plantas são atacadas, principalmente, por fungos fitopatogênicos (GAYATRIDEVI et al., 2012).

Nas plantas, as polifenoloxidasas estão geralmente distribuídas em toda sua estrutura, podendo alguns órgãos ou tecidos em maiores concentrações. O nível pode variar em função da espécie, cultivar ou do ambiente, podendo sua expressão ser induzida ou inibida em algumas plantas por estresses como injúrias, toxicidade de nitrogênio e ataque de patógenos (SANCHEZ et al., 2000). A medida que ocorre a ruptura da célula ocasionada por ferimentos, ação de insetos ou patógenos, ou ainda, senescência, as polifenoloxidasas são liberadas e iniciam o processo de oxidação dos compostos fenólicos, também participam do processo de lignificação durante a invasão do patógeno (THIPYAPONG et al., 2004).

Ascorbato peroxidase é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons. O  $H_2O_2$  é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) produzido pelo metabolismo aeróbico e em situações de estresse biótico ou abiótico (LI

et al., 2007). A ascorbato peroxidase desempenha papel chave na eliminação de  $H_2O_2$  nos cloroplastos e citossol. Podem ocorrer mudanças na atividade dessa enzima em resposta ao estresse causado por fitopatógenos ou pelo ambiente, e que o aumento dessa atividade pode estar relacionado à tolerância a esses estresses (LEE et al., 2001)

## **CAPÍTULO I**

### **INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) UTILIZANDO ACIBENZOLAR-S-METIL NO CONTROLE DA ANTRACNOSE**

#### **RESUMO**



O feijão caupi [*Vigna unguiculata*(L.) Walp.] é uma leguminosa de grande importância para a humanidade devido a sua diversificação na renda de muitas propriedades, pois é caracterizada como cultura de subsistência e também por ser cultivada por médios e grandes produtores. A antracnose é a principal doença da cultura do feijão, podendo promover perdas totais em combinações de cultivar suscetível e clima favorável ao desenvolvimento do fungo agente causal, *Colletotrichum lindemuthianum*. A utilização da indução de resistência torna-se uma alternativa para controle desse micro-organismo, pois ativa os mecanismos latentes de resistência da planta com o uso de agentes bióticos ou abióticos. Entre os indutores, destaca-se o acibenzolar-S-metil (ASM). Dessa forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e a ativação de enzimas relacionadas à patogenicidade. O estudo foi conduzido em casa de vegetação no município de Garanhuns – PE. Os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial (5x4x3), cinco tratamentos, 4 repetições e 3 períodos de coleta, totalizando 60 unidades experimentais. As plantas receberam os tratamentos da seguinte forma: TRATAMENTO1 (0,15gL<sup>-1</sup>); TRATAMENTO 2 (0,30gL<sup>-1</sup>); TRATAMENTO 3 (0,45gL<sup>-1</sup>), TRATAMENTO 4 (0,60gL<sup>-1</sup>) e controle. Quatro dias após a inoculação a maior dose do indutor de resistência promoveu maior a atividade para ascorbato peroxidase, esta enzima apresentou diferença significativa entre os demais tratamentos. No oitavo dia após a inoculação a dose 0,15gL<sup>-1</sup> aumentou a atividade de ascorbato peroxidase. No décimo segundo dia após a inoculação quando aplicou-se 0,30gL<sup>-1</sup> do indutor de resistência a catalase apresentou a maior atividade enzimática. O índice de severidade da doença quatro dias após a inoculação foi maior nas plantas controle e os tratamentos com maiores doses do acibenzolar-S-metil proporcionaram maior atividade enzimática e conseqüentemente maior resistência às plantas de feijão caupi.

**Palavras-chave:** *Colletotrichum lindemuthianum*, feijão caupi, peroxidase, catalase, polifenoxidase, ascorbato peroxidase, acibenzolar-S-metil.

## ABSTRACT

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is a legume of great importance for humanity due to its diversification in the income of many properties, it is characterized as subsistence crop and also be grown for medium and large producers. Anthracnose is the main bean crop disease and can promote overall losses in combinations of susceptible cultivar and favorable climate for the development of the fungus causal agent, *Colletotrichum lindemuthianum*. The use of induced resistance becomes an alternative for the control of microorganism thus activates the latent mechanisms of plant resistance using biotic and abiotic agents. Among the inductors, highlight the acibenzolar-S-methyl (ASM). The study was conducted in a greenhouse in the city of Garanhuns - PE. The treatments were arranged in a factorial design (5x4x3), five treatments, 4 replicates and three collection periods, totaling 60 experimental units. The plants were treated with the treatments as follows: treatment 1 (0.15g/L); TREATMENT 2 (0.30g/L-1); 3 TREATMENT (0.45g/L-1), Treatment 4 (0.60g/L-1) and control. Thus, the study aimed to evaluate the acibenzolar-S-methyl efficiency in cowpea in controlling anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* and activation of enzymes related to pathogenicidade. Quatro days after inoculation the highest dose of resistance inducer promoted greater activity for peroxidase ascorbate, this enzyme showed significant differences between the other treatments. On the eighth day after inoculation the 0.15g/L-1 dose increased the activity of ascorbate peroxidase. On the twelfth day after inoculation when applied 0.30g/L-1 of resistance inducer the catalase showed the highest enzymatic activity. The disease severity index four days after inoculation plants was higher in the control and treatment with higher doses of acibenzolar-S-methyl resulted in higher enzyme activity and consequently greater resistance to cowpea plants.

**Key words:** *Colletotrichum lindemuthianum*, cowpea, catalase, ascorbate peroxidase, acibenzolar-S-methyl.

## 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro [*Vigna unguiculata* (L.) Walp)], também conhecido como feijão macassar, feijão caupi ou feijão de corda, é uma leguminosa de grande importância ao consumo humano, pois é rica em proteínas e aminoácidos, e também pode ser utilizada para diversificação de renda nas propriedades rurais (SILVA et al., 2013). É uma cultura de grande relevância socioeconômica, notadamente em razão da grande quantidade de mão de obra que o seu cultivo demanda gerando diversos empregos diretos e indiretos (SALGADO et al., 2012).

A antracnose é a principal doença da cultura do feijão, podendo promover perdas totais em combinações de cultivar suscetível e clima favorável ao desenvolvimento do fungo agente causal (ANTUNES et al., 2003). Sob condições favoráveis, pode causar danos de até 100%. A alta variabilidade patogênica do *Colletotrichum lindemuthianum* tem sido detectada em muitas áreas das Américas, criando assim dificuldades para a incorporação de uma resistência duradoura do feijão, já que esta variabilidade nestas áreas aumenta (BALARDIN e RODRIGUES, 1995).

A demanda pelo uso sistemático de fungicidas, além de aumentar os custos, ainda pode selecionar espécies de patógenos resistentes, quando utilizado de forma inadequada, dificultando ainda mais o manejo da doença. A utilização da indução de resistência torna-se uma alternativa a esta prática, pois, ativa os mecanismos latentes de resistência da planta com o uso de agentes bióticos ou abióticos. Entre os indutores, destaca-se o acibenzolar-S-metil (ASM) (AMARAL et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; JÚNIOR et al., 2009; SILVA et al., 2010). O ASM é um indutor de resistência que não possui ação antimicrobiana direta, que interfere nos processos fisiológicos e/ou bioquímicos das plantas, como a produção de fenóis, ativando a resistência sistêmica (DEBONA et al., 2009; FURTADO et al., 2010).

Dessa forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* e a ativação de enzimas relacionadas à patogenicidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1. Descrição da área de estudo

O estudo foi conduzido na Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE, em Casa de Vegetação, no município de Garanhuns – PE, agreste meridional, localizado sob as coordenadas geográficas: 08°53'25" de latitude S e 36°29'34" de longitude O, com altitude média de 896 m. O clima da região é do tipo Mesotérmico Cs'a, com temperatura média anual de 20°C e precipitação média em torno de 1.300 mm.

## 2.2. Obtenção do micro-organismo

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 foi obtido da Coleção de Culturas da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

## 2.3. Produção das plantas em casa de vegetação e aplicação do indutor

Plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) foram cultivadas em vasos de 4L, contendo mistura de solo, areia e matéria orgânica (2:1:2) e mantidos em casa de vegetação. As sementes de feijão da cultivar IPA 206, de ciclo precoce (65-72 dias) foram fornecidas pelo Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). As plantas foram regadas uma vez ao dia todos os dias da condução do experimento, totalizando trinta e dois dias em casa de vegetação.

Os tratamentos foram dispostos em um arranjo fatorial (5x4), cinco tratamentos, 4 repetições com 3 períodos de coleta, totalizando 60 unidades experimentais. Assim, as plantas receberam os tratamentos da seguinte forma: TRATAMENTO 1 (0,15gL<sup>-1</sup>); TRATAMENTO 2 (0,30gL<sup>-1</sup>); TRATAMENTO 3 (0,45gL<sup>-1</sup>), TRATAMENTO 4 (0,60gL<sup>-1</sup>) e CONTROLE (água destilada). Quatro sementes foram semeadas em cada vaso. O acibenzolar-S-metil foi aplicado pulverizando-se 10 mL de solução por planta.

Em casa de vegetação foram cultivadas plantas de feijão caupi, com a germinação ocorrendo ao 5º dia após a semeadura. Ao 18º dia após a emergência procedeu-se a pulverização com as diferentes doses do Bion e água destilada (controle), todos no volume de 10 mL nas primeiras folhas da planta. Dois dias após o tratamento, quando as plantas já apresentavam três pares de folhas formadas, foi inoculado *Colletotrichum lindemuthianum*, na concentração de 7,6x10<sup>6</sup> conídios por mL. As plantas foram mantidas

cobertas com sacos plásticos durante 4 dias para favorecer o desenvolvimento do fungo (Figura 1). Foram realizadas coletas ao 24°, 28° e 32° após a emergência (4, 8 e 12 dias após a inoculação) para posterior determinação das atividades enzimáticas.



**Figura 1.** Fotografia do experimento em casa de vegetação, sacos plásticos colocados em cada vaso para favorecer o desenvolvimento do micro-organismo (Fonte: Siqueira, I.T.D., 2014).

#### **2.4. Obtenção das amostras de tecido foliar**

Para realização das determinações analíticas, em cada amostragem, 1 par de folhas de feijoeiro completamente formadas foram coletadas das plantas de cada tratamento e rapidamente armazenadas em freezer. As coletas foram efetuadas aos 4, 8 e 12 dias após a inoculação. Para a obtenção dos extratos vegetais utilizados nas determinações das atividades enzimáticas, amostras congeladas das folhas foram pesadas (0,1g de amostra de tecido vegetal) e maceradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/v) até a obtenção de um pó fino que em seguida foi homogeneizado em solução tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e, posteriormente centrifugado a 10.000×g por 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para as determinações enzimáticas (ANDRADE et al., 2013).

#### **2.5. Determinações enzimáticas**

##### **2.5.1. Peroxidase**

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, por método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999). A cubeta de referência continha 2,5mL da solução com 135 µL de guaiacol, 50 µL de peróxido de hidrogênio e 50 µL do extrato proteico. A atividade de peroxidase foi expressa em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF. A absorbância foi lida no tempo 0 e após 60 segundos. As leituras foram feitas em cinco amostras de cada tratamento.

### **2.5.2. Catalase**

A atividade de catalase foi determinada usando-se EDTA (1mM), peróxido de hidrogênio 100mM, dissolvido em solução tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0). A reação se desenvolveu misturando-se 1390µL de tampão, 50 µL do extrato enzimático, 60µL de peróxido de hidrogênio. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 240 nm, no tempo 0 e após 60 segundos. Os resultados foram expressos em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF. As leituras foram realizadas em cinco amostras de cada tratamento.

### **2.5.3. Polifenoloxidase**

A atividade de polifenoloxidase (PFO) foi determinada segundo a metodologia de Kar e Mishra (1976), com adaptações. O substrato foi composto por pirogalol, na concentração de 50 mM, dissolvido em solução tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 1mL de pirogalol, 25 µL do extrato enzimático, após cinco minutos interrompeu-se a reação com a adição de 25 µL de ácido sulfúrico (5%). As leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 420 nm. Os resultados foram expressos em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF. As leituras foram feitas em cinco amostras de cada tratamento.

### **2.5.4. Ascorbato peroxidase**

A atividade de ascorbato peroxidase foi determinada usando-se EDTA (1mM), peróxido de hidrogênio 100mM, e ácido ascórbico, dissolvido em solução tampão fosfato

de potássio 50 mM (pH 6,0). A reação se desenvolveu misturando-se 1335 $\mu$ L de tampão, 75  $\mu$ L do extrato enzimático, 75 $\mu$ L de ascorbato e 15 $\mu$ L de peróxido de hidrogênio. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 290 nm, no tempo 0 e após 60 segundos. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposto min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MF. As leituras foram feitas em cinco amostras de cada tratamento.

## **2.6. Avaliação da doença**

A severidade da antracnose foi avaliada 10 dias após a inoculação do micro-organismo. Para tanto, foi utilizada a escala de notas de Rava et al. (1993) que varia de 1 a 9, sendo: 1 = ausência de sintomas; 2 = até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior da folha; 3 = maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau 2, até 3% das nervuras afetadas; 4 = até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha; 5 = maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau 4, até 3% das nervuras afetadas; 6 = manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces da folha, presença de algumas lesões nos talos, ramos e pecíolos; 7 = manchas necróticas na maioria das nervuras, com grande parte do tecido do mesófilo adjacente rompendo-se e presença abundante de lesões nos talos, ramos e pecíolos; 8 = manchas necróticas quassena totalidade das nervuras, ocasionando rompimento, desfolha, e redução do crescimento das plantas, assim como lesões muito abundantes nos talos, ramos e pecíolos; 9 = maioria das plantas mortas. Em seguida, as notas foram transformadas para porcentagem de área foliar afetada conforme descrito por Marques Júnior et al. (1997).

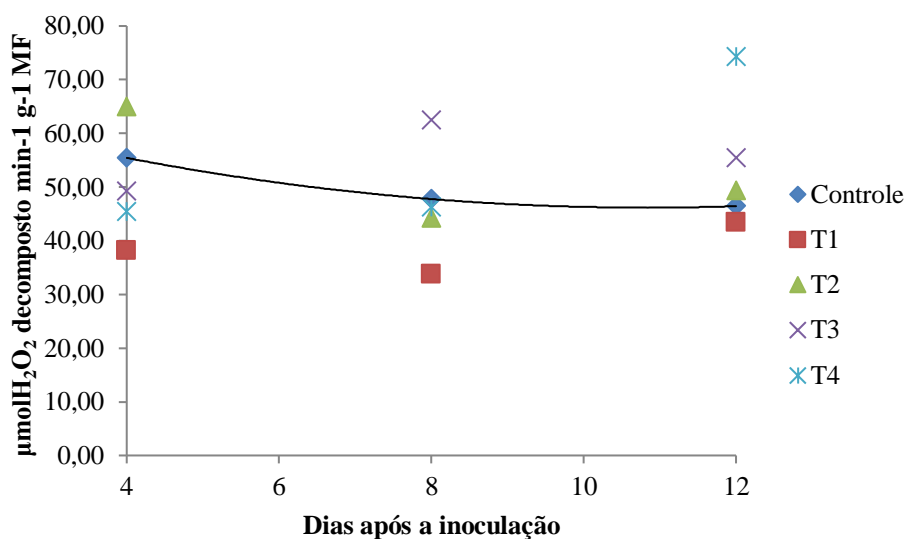
## **2.7. Análise estatística**

Para a análise estatística será utilizado o programa SISVAR. Será feita, ainda, análise de regressão linear de segunda grau para verificar a associação entre as variáveis estudadas. Para isso será utilizado o programa SISVAR e os gráficos obtidos no programa Excel, versão 2007-2010.

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Peroxidase**

A atividade de peroxidase obtida em folhas de feijão caupi cultivar IPA 206, apresentada na Figura 2, pode-se observar que ocorreu um aumento da atividade da enzima no oitavo dia após a inoculação quando se aplicou  $0,45\text{gL}^{-1}$  de indutor. Ao décimo segundo dia após a inoculação houve aumento da atividade quando aplicou-se a maior dose do indutor de resistência e um leve aumento quando aplicou-se a menor dose do indutor.



**Figura2.** Atividade da peroxidase em folhas de feijão caupi, cultivar IPA 206, nos diferentes tempos de inoculação com *C. lindemuthianum*. Equação Polinomial.  $y = 0,198x^2 - 4,296x + 69,44$  ( $R^2 = 1$ ).

Campos et al. (2004) obtiveram resultados significativamente elevados de peroxidase em plantas de feijão comum tratadas com indutor de resistência. Constataram que aumentos na atividade da peroxidase, podem indicar aumento na biossíntese de lignina, que atua como uma barreira à infecção microbiana e também pode promover aumentos na concentração de produtos de oxidação de fenólicos.

A atividade de enzimas oxidativas como peroxidases desempenha um papel importante como parte do mecanismo de defesa induzida em plantas (SÁNCHEZ et al., 2000; RESENDE et al., 2002). Os mecanismos de defesa em resposta aos ataques de fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas-chave nos metabolismos primário e secundário (ARAÚJO; MENEZES, 2009). Neste contexto o grupo de peroxidases representa um papel importante no mecanismo de defesa, mudanças na atividade destas enzimas têm sido frequentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes interações patógeno-hospedeiro (VIECELLI et al., 2010).



Esse fato sugere que ao aumentar a dose do indutor de resistência em estudo e para as condições em que o trabalho foi conduzido, há maior atividade desta enzima, e consequentemente maior defesa da planta quando submetida a ataques do patógeno. Cavalcanti et al. (2004) ainda reforça a hipótese afirmando que o acibenzolar-S-metil (ASM) atua no aumento da atividade de enzimas envolvidas na resistência das plantas.

De acordo com Cavalcanti et al. (2006), a atividade de peroxidase foi induzida em tomateiro pulverizado com acibenzolar-S-metil e inoculado com *Xanthomonas campestris*. Baysal et al. (2003) também verificaram que plantas de tomateiro pulverizadas com acibenzolar-S-metil apresentaram maior atividade de peroxidase quando infectadas por *Clavibacter michiganensis*.

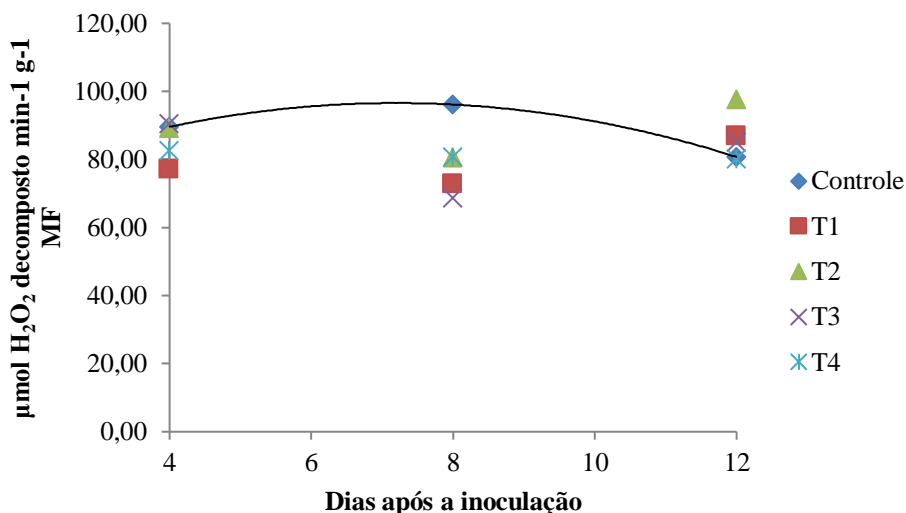
Muitos estudos apontam redução da intensidade de doenças em diversas culturas quando tratadas com ASM, e que muitas vezes o período de absorção e assimilação pela planta é mais importante que diferentes doses utilizadas (CAMPOS et al., 2009; BALDO et al., 2011; ALAMINO et al., 2013). Esta enzima possui grande afinidade com substratos envolvidos na lignificação da parede celular e os produtos da sua atividade também possuem atividade antimicrobiana direta na presença de peróxido de hidrogênio. A peroxidase está relacionada com o processo de proteção antioxidativa, o qual promove o aumento na síntese de lignina que fortalece a parede celular contra a ação de enzimas líticas produzidas pelos patógenos (ANDRADE et al., 2013).

As peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina. Esse polímero, juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração do patógeno. Além disso, esta enzima também participa da biossíntese do etileno, e na oxidação de ácido indol acético (AIA) e de compostos fenólicos (CAVALCANTI et al., 2005).

### **3.2. Catalase**

A atividade de catalase obtida em folhas de feijão caupi cultivar IPA 206, apresentada na Figura 3, pode-se verificar aumento na atividade enzimática a partir do oitavo dia após a inoculação quando aplicou-se  $0,45\text{gL}^{-1}$  de indutor e redução da atividade

nos tratamentos 1, 2, 3 e 4. No décimo segundo dia após a inoculação ocorreu aumento da atividade de catalase nos tratamentos 1, 2 e 3.



**Figura3.** Atividade de catalase em folhas de feijão caupi, cultivar IPA 206, nos diferentes tempos de inoculação com *C. lindemuthianum*. Equação Polinomial.  $y = -0,685x^2 + 9,862x + 61,10$  ( $R^2 = 1$ ).

Segundo Deuner et al. (2011) a redução na atividade de catalase ocasiona um excessivo estresse causado pelo ataque de um fitopatógeno. Quando essa enzima não atua de forma eficiente, a peroxidação lipídica se torna mais evidente, sendo este o principal sintoma atribuído ao dano oxidativo, frequentemente utilizada como um indicador de dano as membranas celulares (HERNANDEZ et al., 2000).

Valente (2011), avaliando a atividade de catalase e os mecanismos de defesa em mudas de cafeeiro, utilizando indutores de resistência feitos a partir de extratos vegetais, contra patógenos chegou à conclusão que o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase pode traduzir uma proteção da planta contra o ataque de determinado patógeno. Observou ainda que pulverizações com indutores aumentaram a atividade da catalase pelo fato de que possuem eliciadores que são reconhecidos pelas plantas, ativam suas respostas de defesa, como o aumento na atividade de enzimas relacionadas à patogenicidade.

Diante disso, pode-se analisar que alguns mecanismos de resistência são ativados após a inoculação das plantas com agentes patogênicos. Em plantas resistentes essa ativação de respostas de defesa é rápida, impedindo ou reduzindo a colonização, o que não ocorre em plantas suscetíveis, pois esse processo é lento. O tratamento prévio com indutores de resistência pode preparar plantas suscetíveis, por meio da ativação rápida de

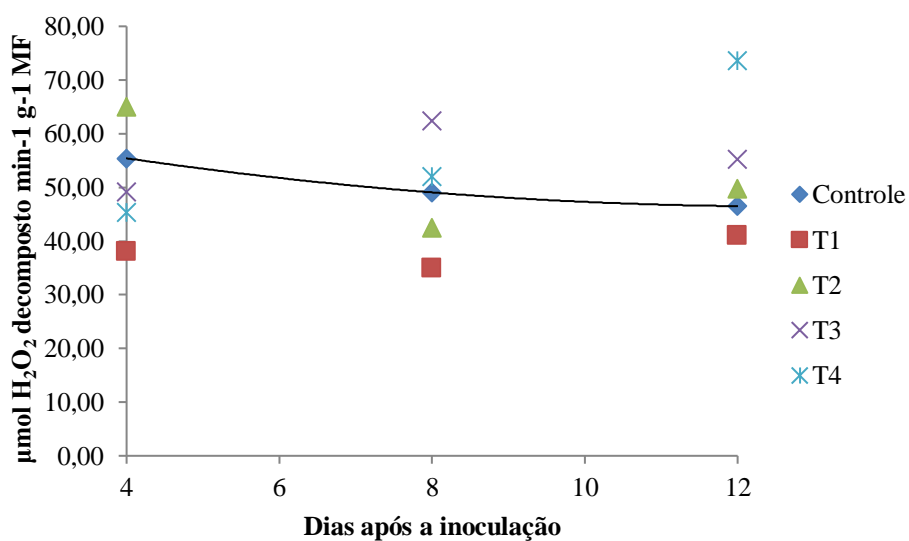
respostas de defesa, e assim reduzir a intensidade de doenças causadas por esses patógenos (PLANCHAMP et al., 2013).

JINDICHOVÁ et al. (2011) trabalhando com plantas de couve e avaliando a interação dessas plantas com um fungo patogênico observaram que o aumento da atividade de catalase reduziu os sintomas da doença nas folhas, diminuiu significativamente o desenvolvimento da necrose em até 20% quando comparadas com as plantas controle.

Em estudos realizados por Xavier et al. (2011) com extratos vegetais na indução de resistência em cafeeiro, observou-se que houve aumento na atividade de catalase a medida que decorria-se o tempo de inoculação. Visto que, a primeira resposta de defesa da planta é a explosão oxidativa ou a geração de espécies ativas de oxigênio. Estes atuam no reforço da parede celular, formando uma barreira mecânica efetiva contra a penetração de patógenos nos tecidos da planta.

### 3.3. Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase obtida em folhas de feijão caupi cultivar IPA 206, apresentada na Figura 4, pode-se verificar que o tratamento 2 respondeu pela maior atividade e foi estatisticamente diferente dos demais. No oitavo dia houve acréscimo da atividade nos tratamentos 3 e 4. No décimo segundo dia após a inoculação é notável o aumento da atividade de polifenoloxidase no tratamento 3.



**Figura4.** Atividade de polifenoloxidase em folhas de feijão caupi, cultivar IPA 206, nos diferentes tempos de inoculação com *C. lindemuthianum*. Equação Polinomial.  $y = 0,119x^2 - 3,024x + 65,61$  ( $R^2 = 1$ ).

Souza et al. (2004) estudando alterações metabólicas associadas ao feijão caupi relataram aumento na atividade de polifenoloxidase quando as plantas sofreram estresse hídrico. A exemplo, Oliveira et al. (2012) observaram em plantas de feijão caupi que a atividade da enzima polifenoloxidase aumentou quando a variedade CE-109 estava parasitada com *Meloidogyne incognita*. Além disto, a atividade enzimática pode ser reduzida ou estimulada com ataque de fitopatógeno e algumas delas, como a polifenoloxidase, podem ter mecanismos de defesa dos hospedeiros a patógenos (ROSSITER et al., 2008)

Silva et al. (2009) observaram em plantas de feijão comum que a aplicação de um indutor de resistência promoveu resposta mais rápida a inoculação com *Xanthomonas axonopodis*, proporcionou aumento expressivo da atividade de polifenoloxidase e conduziu maior resistência às plantas.

Orober et al. (1999) constataram que geralmente ocorre maior atividade da polifenoloxidase nos tecidos infectados de cultivares resistentes do que em tecidos infectados de cultivares suscetíveis ou em plantas sadias. A importância da atividade da polifenoloxidase na resistência a doenças deve-se, provavelmente, à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microorganismos do que o fenol original, e à sua ação protetora no local do ferimento. Ngadze et al. (2011) relacionaram o aumento da atividade da polifenoloxidase com a maior resistência de tubérculos de batata a *Pectobacterium atrosepticum*.

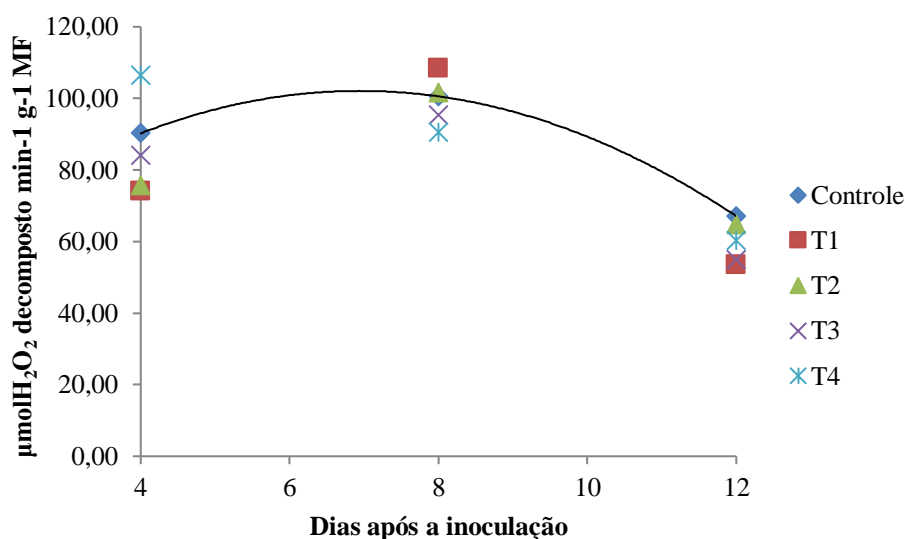
Por esta razão, admite-se que um aumento na atividade da polifenoloxidase resulta em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação e, portanto, maior grau de resistência à infecção (ZHENG-CUIMING et al., 1999).

Em trabalhos com indução de resistência em tomateiro utilizando acibenzolar-S-metil Itako et al. (2012) observou que a aplicação desse indutor aumentou a atividade da polifenoloxidase em plantas de tomateiro, confirmando sua capacidade de induzir resistência em plantas cultivadas, evidenciando que este produto tem relação direta com a indução de resistência a antracnose em plantas de feijão caupi. Observaram também que o acibenzolar-S-metil induziu a atividade de polifenoloxidase evidenciando que este produto induziu a resistência em plantas de tomateiro. Cavalcanti et al. (2006) atribui o

fato de que a atividade dessa enzima está correlacionada com a resistência induzida, ou seja, ativação desse produto na atividade dessa enzima, sendo produzidas algumas horas após a pulverização e até 12 dias após.

### 3.4. Ascorbato peroxidase

A atividade de ascorbato peroxidase obtida em folhas de feijão caupi cultivar IPA 206, apresentada na Figura 5, observa-se que a maior dose contribuiu para a maior atividade. No oitavo dia após a inoculação é notável o aumento da atividade nos tratamentos 1, 2 e 3 e redução da atividade enzimática para os demais tratamentos (controle e T4). No décimo segundo dia após a inoculação observa-se decréscimo na atividade enzimática em todos os tratamentos.



**Figura 5.** Atividade de ascorbato peroxidase em folhas de feijão caupi, cultivar IPA 206, nos diferentes tempos de inoculação com *C. lindemuthianum*. Equação Polinomial.  $y = -1,37x^2 + 19,02x + 36,05$  ( $R^2 = 1$ ).

Ascorbato peroxidase é considerada umas das peroxidases mais importantes, pois catalisa a redução do  $H_2O_2$ , por meio do poder redutor do ascorbato (SHIGEOKA et al., 2002). Leite et al (2004) trabalhando com resistência induzida em feijão comum observou que níveis elevados desta enzima são mais atuantes e constantes precocemente, podendo contribuir na resistência a antracnose, reduzindo os efeitos danosos do *C. lindemuthianum*.

Lanubile et al. (2012) em trabalhos realizados com milho observou que em plantas resistentes houve maior atividade de ascorbato peroxidase, podendo esta enzima está relacionada à prevenção da formação de  $OH^\cdot$  e efeitos tóxicos da acumulação de  $H_2O_2$ .

As ascorbato peroxidases apresentam várias isoformas distribuídas por diversos compartimentos celulares. Esta enzima representa componentes importantes do sistema de proteção oxidativa nas folhas e nas raízes de feijão caupi (CAVALCANTI et al., 2007).

Ahsan et al. (2010) trabalhando com plantas de soja expostas a elevadas temperaturas constataram aumento na atividade de ascorbato peroxidase. Isso explica o fato de que muitas vezes uma planta quando submetida a uma condição de ataque de fitopatógeno ou qualquer outro tipo de estresse que venha a comprometer a suas atividades pode aumentar a atividade de determinada enzima como medida de proteção a este agente, estando envolvida no processo de proteção de planta. Alamino et al. (2013) constataram que me plantas de maçã submetidas ao tratamento com acibenzolar-S-metil apresentaram valores numericamente maiores que a testemunha na atividade de ascorbato peroxidase. A redução da atividade de ascorbato peroxidase no décimo dia após a inoculação pode estar relacionada a potencialização reduzida do indutor após alguns dias decorrentes à inoculação ou até mesmo a baixa incidência do patógeno nesse período.

Suza et al. (2010), relataram que algumas espécies de plantas, após sofrerem algum tipo de lesão, apresentam uma queda na concentração de ácido ascórbico, que participa de reações de detoxificação, de forma enzimática e não enzimática de espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo celular aeróbico e por estresses bióticos e abióticos.

### **3.5. Severidade da doença**

A Tabela 5 traz os dados do índice de severidade da antracnose em plantas de feijão caupi. Verifica-se que a severidade da doença é maior no quarto dia após a inoculação

quando se aplicou apenas água nas plantas. No oitavo dia após a inoculação a severidade da doença apresentou redução quando as plantas foram submetidas a uma maior dose de indutor ( $0,45\text{gL}^{-1}$ ). No décimo segundo dia após a inoculação a severidade da doença apresentou redução quando as plantas foram submetidas a aplicação com  $0,45\text{gL}^{-1}$  do indutor.

**Tabela 5.** Índice de severidade da infecção por *Colletotrichum lindemuthianum*, do feijão caupi, cultivar IPA 206, para os diferentes tratamentos, em função do tempo de inoculação com *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Dias após inoculação		
	4	8	12
Testemunha	0,76 d	0,65 a	0,70 c
T1 ( $0,15\text{gL}^{-1}$ )	0,10 a	0,70 a	0,96 a
T2 ( $0,30\text{gL}^{-1}$ )	0,43 b	0,45 b	0,76 b
T3 ( $0,45\text{gL}^{-1}$ )	0,30 c	0,30 c	0,61 c
T4 ( $0,60\text{gL}^{-1}$ )	0,38 b	0,31 c	0,66 c
<b>CV%</b>	<b>45,56</b>	<b>42,84</b>	<b>41,98</b>

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

As atividades de catalase e ascorbato peroxidase apresentaram 97,662 e 108,368  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  decomposto  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  MF, respectivamente, alta atividade enzimática em relação às demais. Campos et al. (2009) relatam que a alta atividade podem ser resultantes da maior

ação hidrolítica das atividades das enzimas sobre os componentes da parede celular. Em meio ao fenômeno de indução de resistência vários autores atribuem a redução da severidade da doença ao aumento da atividade de enzimas associadas a proteção de plantas (VIDHYASEKARAM et al., 2001; PENG et al., 2004).

#### **4. CONCLUSÃO**

- Os tratamentos com maiores doses do acibenzolar-S-metil proporcionaram maior atividade enzimática e conseqüentemente maior resistência às plantas de feijão caupi;
- A severidade da antracnose foi reduzida com a utilização do indutor de resistência.



## 5. REFERÊNCIAS

AHSAN, N.; DONNART, T.; NOURI, M-Z.; KOMATSU, S. Tissue-Specific Defense and Thermo-Adaptive Mechanisms of Soybean Seedling under heat Stress Revealed by Proteômica Approach. **Journal of Proteome Research**, 9:4289-4204. (2010).

ALAMINO, D. A.; CABRAL, V. B.; DANNER, M. A.; MARCHESE, J. A. Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.48, n.3, p.249-254, mar. 2013.

AMARAL, D.R.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; BOREL, J.C.; MAC LEOD, R.E.O.; PÁDUA, M.A. Silicato de potássio na proteção do cafeeiro contra *Cercospora coffeicola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 6, 2008.

ANDRADE, C.C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology** 38 (1) January - February 2013.

ANTUNES, I. F. et al. **Reação de cultivares crioulas de feijão do Rio Grande do Sul a Isolados de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose.** In: I Congresso Brasileiro de Agroecologia, IV Seminário Internacional sobre Agroecologia, V Seminário Estadual sobre Agroecologia, 2003, Porto Alegre. 2003.

ARAÚJO, F.F. de; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores bióticos (*Bacillus subtilis*) e abióticos (acibenzolar-S-metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p. 169-172, 2009.

BALARDIN, R. S.; RODRIGUES, J. V. C. Sensibilidade “*in vitro*” de raças *Colletotrichum lindemuthianum* fungicidas sistêmicos e protetores. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 494-497. 1995.

BALDO, M.; STANGARLIN, J.R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus* inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.4, p.174-179, 2011.

BAYSAL O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methylin tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Plant Pathology** 52:747-753, 2003.

BLANCO, F. F.; CARDOSO, M. J.; FILHO, F. R. F; VELOSO, M. E.C; NOGUEIRA, N. C. C. P. e DIAS, N. da S. Milho verde e feijão caupi cultivadas em consórcio sob diferentes lâminas de irrigação e doses de fósforo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.46, n.5, p.524-530, maio 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **BION 500 WG**. Disponível

em:<[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/BION\\_500\\_WG.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/BION_500_WG.pdf)>. Acesso em 16 de dezembro de 2014.

CAVALCANTI, F.R.; LIMA, J.P.M.S.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIEGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress And recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology** **164**: 591-600. 2007.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.C.B.C.; CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **41**: 1721-1730. 2006.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, J. P. M. S.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Activities of antioxidant and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activator sand inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **68**:198-208, 2006.

CAVALCANTI, L. S.; RESENDE, M. L. V. Efeito da época de aplicação e dosagem do Acibenzolar- S-Metil na indução de resistência a murcha-de-verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 67-71, 2004.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005, p.81-124

DAMASCENO-SILVA, K. J. D. Estatística da produção de feijão-caupi. Grupo cultivar. 2009. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/arquivos/estatistica.pdf>>. Acesso em 15 de julho de 2013.

DEBONA, D.; FIGUEIROÓ, G. G.; CORTE, G. D.; NAVARINI, L.; DOMINGUES, L. D. S.; BALARDIN, R. S. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e acibenzolar-

S-methyl no controle da ferrugem asiática e crescimento de plântulas em cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, 2009.

**FAO. FAOSTAT.** Crops. Cowpeas, dry. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em 15 de dezembro de 2014.

FONSECA, M. R. et al. Teor e acúmulo de nutrientes por plantas de feijão caupi em função do fósforo e da saturação por bases. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém v. 53, n. 2, p. 195 – 205, 2010.

FREIRE FILHO, F. R., RIBEIRO, V. Q., BARRETO, P. D., SANTOS, A. A. melhoramento Genético. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q. (Ed.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 29-92.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. In: OLIVEIRA, G. A. Efeito da irrigação e doses de fósforo sobre o feijão caupi cultivado em campo e em casa de vegetação. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Roraima. Boa Vista – RR. 65p. 2011.

FURTADO, L. M.; RODRIGUES, A. A. C.; ARAÚJO, V. S.; SILVA, L. L. S.; CATARINO, A. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar – s – metil (ASM) no Controle da Antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.237-239, 2010.

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

HERMS, S.; SEEHAUS, K.; KOEHLE, H.; CONRATH, U. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. **Plant Physiology** 130, 120-127. 2002.

HERNÁNDEZ, J.A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea plants (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell and Environment**, v.23, p.853-862, 2000.

ISHIGE, F.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**. v.101, p.193-199, 1993.

ITAKO, A. T.; JÚNIOR, J. B. T.; JÚNIOR, T. A. F. da. S.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. IDESIA (Chile) Volumen 30, N. 2, Mayo-Agosto, 2012.

JIND\_ICHOVÁ, B.; FODOR J.; SINDELÁROVÁ, M.; BURKETOVÁ, L.; VALENTOVÁ, O. Role of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the interaction between a hemibiotrophic fungal pathogen, *Leptosphaeria maculans*, and oilseed rape. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p.149 -156, 2011.

JÚNIOR, L. A. Z.; FONTES, R. L. F.; ÁVILA, V. T. Notas Científicas Aplicação do silício para aumentar a resistência do arroz à mancha-parda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 203-206, 2009.

KAR, M. & MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology** 57:315-319. 1976.

KIM, Y.J.; HWANG, B.K. Differential accumulation of beta-1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. **Plant Physiology**, v.45, p.195-209, 1994.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v.120, p. 501-512, 1999.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-s-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** 2007. 140p. Tese. (Doutorado em Fitopatologia) – Esalq, Piracicaba, 2007.

LANUBILE, A.; BERNARDI, J.; MAROCCO, A.; LOGRIECO, A.; PACIOLLA, C. Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides*. **Environmental and Experimental Botany** 78, 39-46. 2012

LEITE, M. DE L.; VIRGENS FILHO, J. S. DAS. Produção de matéria seca em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) submetida a déficit hídrico. **Ciências Exatas e da Terra**, v.10, p.43-51, 2004.

LEE, D.H.; KIM, Y.S.; LEE C.B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.737-745, 2001.

LI, S.G.; PATTENDEN, D.; LEE, J.; GUTIERREZ, J.; CHEN, C.; SEIDEL, J.; GERTON, J.L. Workman Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102 (2005), pp. 18385–18390. 2005.

LUSSO, M. F. G.; PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. In: KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-s-metil e**

***Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção. 2007. 140p.** Tese. (Doutorado em Fitopatologia) – Esalq, Piracicaba, 2007.

MARQUES JÚNIOR, O. G. M.; RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; SANTOS, J. B. Viabilidade do emprego de notas na avaliação de alguns caracteres do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 44, n. 254, p. 411-420, 1997.

MELO, A. R. B. ; BARBOSA, Z. ; VIÉGAS, R. A. ; SILVEIRA, J. A. G. Acumulação de solutos e ajustamento osmótico em plantas de caupi [*Vigna unguiculata* (Walp) L.] submetidas à salinidade. In: VII congresso brasileiro de fisiologia vegetal, 1999, BRASÍLIA, 1999.

OLIVEIRA, J. T. A.; ANDRADE, N. C.; MIRANDA, A. S. M.; SOARES, A. A.; GONDIM, D. M. F.; ARAÚJO FILHO, J. H.; FREIRE FILHO, F. R.; Vasconcelos, I. M. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.51, p.145-152, 2012.

PENG, X.; ZHANG, H.; BAI, Z.; LI, B. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.32, p. 377-387, 2004.

PEREIRA, R. B.; ALVES, E.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; RESENDE, M. D.; LUCAS, G. C.; FERREIRA, J. B. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 10, p. 1287-1296, 2008.

PLANCHAMP, C.; BALMER, D.; HUND, A.; MAUCH-MANI, B. A soil-free root observation system for the study of root-microorganism interactions in maize. **Plant Soil** 367, 605–614. (2013).

PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; MARTIN, B. A.; STEWART, C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v. 6, p. 65-74, 1994.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 388-391, set. 1993.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.51, p.621-628, 2002.

ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Orgs) Interação planta-patógeno: **Fisiologia e Biologia Molecular**. Piracicaba. Fealq. pp. 411-429. (2008).

ROSSITER, J. G. DE A.; MUSSER, R. DOS S.; MARTINS, L. S. S.; PEDROSA, E. M. R.; MEDEIROS, J. M. de. Seleção de genótipos de aceloleira assistida por marcadores isoenzimáticos visando à resistência a *Meloidogyne incógnita* raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p. 1057-1064, 2008.

SALGADO, F. H. M.; SILVA, J.; OLIVEIRA, T. C.; BARROS, H. B.; PASSOS, N. G.; FIDELIS, R. B. Eficiência de genótipos de feijoeiro em resposta à adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.42, n.4, p.368-374, 2012

SANCHEZ, E.; SOTO, J. M.; GARCÍA, P. C.; LÓPEZ-LEFEBRE, L. R.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, p. 973-978, 2000.



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** **53**: 1305-1319. 2002.

SILVA E. G.; MOURA A. B.; BACARIN, M.A.; DEUNER, C.C. Metabolic alterations on bean plants originated from microbiolization of seeds with *Pseudomonas* sp. and inoculated with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.98-104, 2009.

SILVA, I. T.; RODRIGUES, F. Á.; OLIVEIRA, J. R.; PEREIRA, S. C.; ANDRADE, C. C. L.; SILVEIRA, P. R.; CONCEIÇÃO, M. M. Wheat resistance to bacterial leaf streak mediated by silicon. **Journal of Phytopathology**, v. 158, n. 4, p. 253-262, 2010.

SILVA, R. P.; CASSIA, M. T.; VOLTARELLI, M. A.; COMPAGNON, A. M.; FURLANI, C. E. A. Qualidade da colheita mecanizada de feijão (*Phaseolus Vulgaris*) em dois sistemas de preparo do solo. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.44, n.1, p.61-69, 2013.

SILVA-LOBO, V.L.; GIORDANO, L.B.; LOPES, C.A. (2005) Herança da resistência a mancha bacteriana em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira** 30:343-349.

SOBRINHO, C.A.; FERREIRA, P.T.; CAVALVANTI, L.S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba. Fealq. pp. 51-80. (2005).

SOUZA, R. P.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGOA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associate metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45-56, 2004.

SUZA, W.P.; AVILA, C.A.; CARRUTHERS, K.; KULKARNI, S; GOGGIN, F. L.; LORENCE, A. Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism. **Plant Phys. And Biochem.** 48:337-350. (2010).

TEÓFILO, E. M.; DUTRA, A. S.; PITIMBEIRA, J. B.; CUNHA DIAS, F. T.; BARBOSA, F. de S. Potencial fisiológico de sementes de feijão caupi produzidas em duas regiões do Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 03, p. 443-448, 2008.

VALENTE, T.C.T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina aminilase ativadas por indutores de resistência em cafeeiro.** 2012. 67p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) UFLA, Lavras, 2012.

VENANCIO, W.S.; RODRIGUES, M.A.T.; BEGLIOMINI, E., SOUZA, N. L. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. **Ciências Agronômicas e Engenharia**.9, 59-68. 2003.

VIDHYASEKARAN, P.; KAMALA, N.; RAMANATHAN, A.; RAJAPPAN, K.; PARANIDHARAN, V.; VELAZHAHAN, R. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pfl against *Xanthomonas oryzae* in rice leaves. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 29, p. 155-167, 2001.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.73-80, 2010.

WORDELL FILHO, J. A.; STADNIK, M. J. Controle integrado da antracnose no feijoeiro. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 21, n. 1, mar. 2008.

XAVIER, K. V. **Extratos de casca de maracujá e laranja na indução de resistência em cafeeiro contra a ferrugem.**2011. 85p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UFLA, Lavras, 2011.