

**ESTERASES DE CINCO CULTIVARES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.),
RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO FUNGO DA ANTRACNOS (*Colletotrichum
lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib).**

ROSEANE CAVALCANTI DOS SANTOS
Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa do
Amendoim - CNPA, Campina Grande, PB.

TÂNIA M. M. DE ARRUDA FALCÃO
Prof. Adjunto-4, Área de Genética, Depto. de Biologia -
UFRPE.

MARIA MENEZES
Prof. Adjunto-4, Depto. de Agronomia - UFRPE.

Padrões esterásicos de folha, caule e raiz, obtidos aos 15,30 e 45 dias após o plantio (dap), foram estudados para cinco cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) resistentes (A-475, AB 136 e CORNEL 49242) e suscetíveis (IPA 74-19 e MICHELITE) ao fungo da antracnose. As diferenças observadas nos padrões esterásicos para tecidos sadios e para tecidos inoculados não foram suficientes para o estabelecimento de uma relação clara dos mesmos com o comportamento de resistência ou de suscetibilidade das cultivares. Todavia, através dos padrões para esterases foi possível caracterizar cada uma das cinco cultivares.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) representa no Brasil uma das principais fontes de alimento para o consumo humano, sendo cultivado em todas as regiões do País, principalmente no Nordeste, onde se concentra a população de menor poder aquisitivo. Esta região contribui com 25% do valor da produção nacional de feijão do tipo mulatinho, por ser este preferido pelo consumidor regional (Kimali, 1980).

O valor nutritivo do feijão *P. vulgaris* constitui tanto base protéica

quanto energética na alimentação (Howard, Schwartz e Galvez, 1983). Entretanto, embora seja uma planta cultivada a nível nacional, sua produtividade ainda é baixa devido a existência de fatores limitantes ao seu cultivo, os quais vão da má qualidade da semente até aos grandes problemas de ordem fitossanitária (Oliveira, 1977). Dentre estes últimos, destaca-se a antracnose, doença de origem fúngica que, dependendo das condições ambientais, provoca prejuízos da ordem de 50% (Miranda et al., 1983). Dentre as formas conhecidas de controle desta doença destaca-se o ideal, a saber, o plantio de variedades resistentes. Entretanto, devido ao fato de existirem diversas raças fisiológicas do fungo *C. lindemuthianum*, a obtenção de cultivares resistentes torna-se difícil e extremamente trabalhosa (Pio Ribeiro e Chaves, 1975; Martins, 1978).

Segundo Shaw (1963), a resistência ou suscetibilidade a uma doença parece fundamentar-se, frequentemente, na regulação da síntese de algumas enzimas, isto porque, várias classes de metabólitos sofrem trocas qualitativas e quantitativas durante o processo de infecção, como as fitoalexinas, por exemplo.

A eletroforese é uma técnica de separação protéica que tem sido largamente utilizada em estudos de variabilidade genética em um grande número de organismos. As variantes detectadas têm muitas aplicações em pesquisas genéticas e bioquímicas. Podem, por exemplo, ser utilizadas em estudos de ligação; na caracterização de populações e cultivares; em estudos ontogenéticos e filogenéticos; na análise da estrutura de proteínas complexas e em estudos da relação patógeno X hospedeiro (Shaw, 1963; Oliveira, 1977).

Considerando a importância da técnica eletroforética, não só pela simplicidade da mesma (Messeguer e Arus, 1985), como por tornar possível a elaboração de inferências sobre os genótipos dos organismos sob estudo (Schwennessen, Mielke e Wolfe, 1982), foi delineado o presente trabalho com o propósito de investigar, em material coletado em três fases do desenvolvimento, os padrões esterásicos de cultivares de feijão (*P. vulgaris*); resistentes e suscetíveis ao fungo da antracnose.

MATERIAL E MÉTODOS

As cultivares estudadas foram obtidas junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) e à Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). A origem dessas cultivares e o comportamento das mesmas quanto ao agente da antracnose são mostrados no quadro abaixo.

Origem e comportamento das cultivares estudadas com relação ao agente da antracnose.

| Nº de Ordem | Denominação da cultivar | Origem | Comportamento |
|-------------|-------------------------|----------|---------------|
| 1 | IPA 74-19 | Brasil | Suscetível |
| 2 | A - 475 | Colômbia | Resistente |
| 3 | AB 136 | Colômbia | Resistente |
| 4 | Cornel 49242 | Holanda | Resistente |
| 5 | Michelite | Holanda | Suscetível |

TESTES DE INOCULAÇÃO

Dezoito sementes de cada cultivar foram plantadas em vasos contendo solo esterilizado, em casa de vegetação. Em cada vaso foram plantadas três sementes. Do total de dezoito plantas de cada cultivar, nove foram utilizadas para os testes de inoculação e nove como testemunhas, estas últimas inoculadas apenas com água destilada.

A suspensão do inóculo foi preparada em água destilada esterilizada, a partir de material obtido através de raspagem da superfície do meio onde o fungo foi desenvolvido. A suspensão do inóculo foi filtrada numa camada dupla de gase, sendo a concentração ajustada para $1,0 \times 10^5$ conídios/ml, através de utilização da câmara de Neubauer (Tavares, 1986).

As inoculações foram efetuadas à tardinha, quando as plântulas estavam com 11 dias após o plantio (dap), sendo efetuadas com auxílio de um atomizador tipo "De vilbiss N15". As plantas de cada vaso receberam 15ml da suspensão de conídios e foram incubadas durante dois dias em câmara úmida dentro de casa de vegetação.

COLETA DA AMOSTRA PARA ANÁLISE ELETROFORÉTICA

Os dados foram obtidos através de análises de folhas, caules e raízes coletados aos 15,30 e 45 dias após o plantio.

Para cada tecido e idade era tomado um grama de material inoculado e um grama de material sadio (não inoculado). Individualmente, o material era triturado em almofariz e homogeneizado em 5ml de tampão

NaCl 0,15 M pH 7,1 , durante um minuto, à temperatura ambiente, segundo técnica desenvolvida por Santos e Falcão (1986). O homogeneizado era então centrifugado por 10 minutos a 7000 rpm, numa centrífuga tipo 315 SE, em tubos de ensaio de 10ml. Após a centrifugação, os tubos eram mantidos em geladeira por 5 minutos e os sobrenadantes eram utilizados nas análises eletroforéticas.

Como meio suporte para o fracionamento protéico foi utilizado gel de poliacrilamida (7%), eletroforese horizontal, sistema descontinuo de tampões (Scandalios, 1969). Os sobrenadantes de cada amostra eram absorvidos em papel de filtro qualitativo tipo Whatman 3M, nas dimensões de 0,7 x 0,5 cm, os quais eram inseridos no gel a 3,0cm do polo negativo. As migrações eletroforéticas eram processadas a 4°C, durante 6 horas, com uma diferença de potencial de 8,8 V/cm de gel.

Para a revelação de esterases foi utilizado o substrato alfa-naftil acetato e o corante Fast Blue RR salt, segundo técnica descrita por Scandalios (1969). O gel era incubado a 37° C, durante 60 minutos, até a visualização perfeita das regiões esterásicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos padrões com boa resolução para todas as cinco cultivares, tanto em número quanto em intensidade de coloração das regiões esterásicas. Um número máximo de cinco regiões foi detectado para tecidos de folhas e caule e um mínimo de três para tecido de raiz.

3.1. PADRÕES ESTERÁSICOS EM TECIDO DE FOLHAS:

Como pode ser observado na Figura 1, EST1 e EST2 foram as regiões mais importantes para a caracterização das cultivares estudadas. Foi observado que as cultivares suscetíveis (IPA 74-19 e Michelite) apresentaram as zonas EST1 e EST2 fortemente coradas em tecidos sadios aos 15 dap (Figura 1A). Em tecidos infectados da cultivar Michelite a intensidade de coloração destas regiões foi inferior, especialmente para EST1. Em tecido sadio da cultivar A-475, a região EST1 não foi detectada e a EST 2 foi fracamente revelada. Em amostras de tecido infectado desta cultivar, as duas regiões foram reveladas, sendo a EST1 menos intensa do que a EST2, esta fortemente corada em relação ao observado para tecido sadio. Comportamento semelhante foi observado para a cultivar Cornel 49242. Por outro lado, comportamento inverso ao das cultivares A-475 e

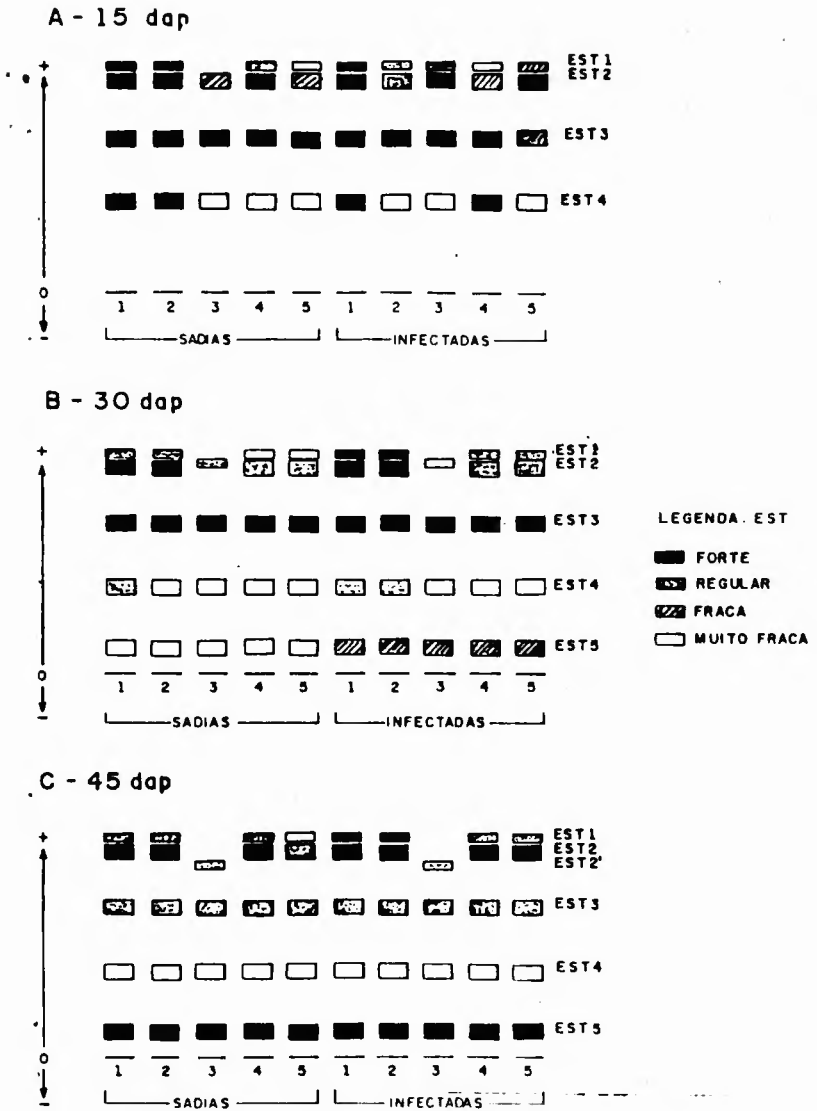


FIGURA 1. Esquema dos perfis eletroforéticos de esterases de folhas, detectadas em tecidos sadios e infectados das cultivares IPA 74-19 (1), Michelite (2), A-475 (3), AB 136 (4), e Cornell 49242 (5). A - material coletado aos 15 dap, B - material coletado aos 30 dap, C - material coletado aos 45 dap. Migração nos sentido indicado.

Cornel 49242 foi observado para a cultivar AB 136, para a qual houve decréscimo na intensidade de revelação de EST1 e da EST2, em tecido infectado. A região EST3 foi detectada em todas as cultivares, tanto em tecidos sadios quanto em tecidos infectados. A região EST4 foi bem visualizada, aos 15 dap, em amostras de tecidos sadios das cultivares IPA 74-19 e Michelite, e de tecidos infectados das cultivares IPA 74-19 e AB 136 (Figura 1A). Aos 30 dap foi visualizada a região EST5, fracamente corada em tecidos sadios e com um discreto aumento de intensidade em tecidos infectados (Figura 1B). Aos 45 dap a região EST5 foi corada fortemente tanto em tecidos sadios quanto infectados de todas as 5 cultivares. Também aos 45 dap foi detectada uma banda muito próxima da EST 2, de mobilidade relativa inferior à desta, a qual recebeu a designação de EST2'. Esta região não foi observada aos 15 e 30 dap. A zona EST2' foi considerada como a provável expressão fenotípica de um outro alelo do loco EST2 até então não detectado. Todavia, pode representar o produto de um alelo de outro loco. Esta região EST2', visualizada apenas em tecidos da cultivar A-475, sadio ou infectado, foi considerada um marcador genético para esta cultivar (Figura 1C).

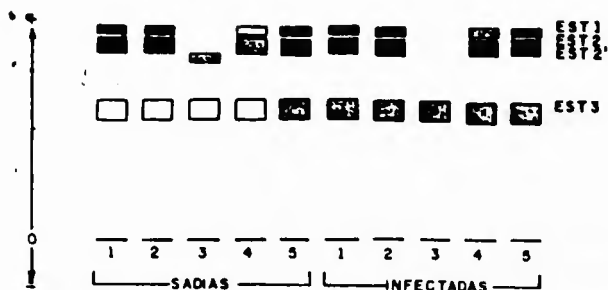
PADRÕES ESTERÁDICOS EM TECIDO DE CAULE:

Cinco regiões foram observadas em tecido de caule, a saber, EST1, EST2, EST3, EST4 e EST5 (Figura 2). Como pode ser observado nesta figura, os padrões das cultivares IPA 74-19 e Michelite foram idênticos em tecidos sadios ou infectados, para as três idades estudadas, com uma única exceção observada para a cultivar Michelite aos 45 dap, quanto à intensidade de coloração das regiões EST1 e EST2 em tecido infectado.

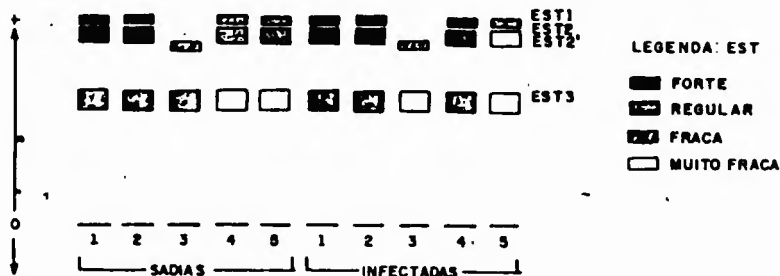
As cultivares resistentes A-475, AB 136 e Cornel 49242 não apresentaram entre si idênticos padrões, quer considerando tecidos sadios quer tecidos infectados. Sabe-se que estas cultivares não manifestam, em campo, o mesmo grau de resistência. Elas também apresentaram diferenciações em seus padrões esterádicos. Tomados isoladamente os dados para tecidos sadios, poder-se-á dizer que as diferenciações observadas nos padrões eletroforéticos das três cultivares resistentes, especialmente os dados de 15 dap, auxiliam na caracterização destas cultivares.

Em tecido de caule foi observado também o marcador EST2' para a cultivar A-475, visualizado a partir dos 15 dap, em tecidos sadios (Figura 2A) e aos 30 e 45 dap, em tecidos sadios e em tecidos infectados (Figura 2, B-C).

A - 15 dap



B - 30 dap



C - 45 dap

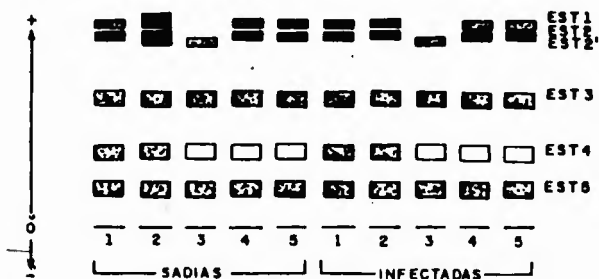


FIGURA 2. Esquema dos perfis eletroforéticos de esterases de caule, detectadas em tecidos sadios e infectados das cultivares IPA 74-19 (1), Michelite (2), A-475 (3), AB 136 (4), e Cornel 49242 (5). A - material coletado aos 15 dap. B - material coletado aos 30 dap, C - material coletado aos 45 dap. Migração nos sentido indicado.

As regiões EST4 e EST5 só foram detectadas aos 45 dap, em todas as amostras, independentemente da sanidade dos tecidos (Figura 2C).

PADRÕES ESTERÁDICOS EM TECIDO DE RAIZ:

Apenas três zonas foram observadas em tecidos de raiz, das quais duas (EST1 e EST2) foram consideradas para fins comparativos.

Aos 30 dap estas duas regiões foram reveladas com forte intensidade de coloração na cultivar IPA 74-19 (susceptível) e AB 136 e Cornel 49242 (resistentes), tanto em tecidos sadios quanto infectados. Por outro lado foram fracamente coradas na cultivar Michelite (susceptível), especialmente em tecido sadio. O mesmo foi observado para a região EST2 da cultivar A-475 (resistente). Nesta última não tendo sido observada a região EST1.

A detecção da região EST2', unicamente para a cultivar A-475, poderá ser de grande valia em estudos posteriores de hibridação que possam ser realizadas com esta cultivar. Poder-se-á arguir que o aparecimento desta região esteja associado a uma alteração secundária da molécula da EST2. Na literatura consultada são apontadas diversas causas para explicar as alterações estruturais que levam à formação de regiões secundárias, entre as quais são salientadas a perda de grupos amina de resíduos glutamina e asparagina (Funakoshi e Deutsch, 1969; Midelfort e Mehler, 1972); metilação, fosforilação e clivagem de uma porção da cadeia polipeptídica por enzimas proteolíticas. Outras alterações secundárias dessas moléculas podendo ser determinado por processos de extração da proteína ou estocagem do extrato contendo a proteína (Harris, 1966). Estes processos normalmente levam ao aparecimento de zonas de migração eletroforética mais rápida que a observada para a região da qual se originou, o que não foi observado em relação a zona EST2'. No que tange a problemas relativos à estocagem, é de se ressaltar que apenas material fresco foi utilizado neste trabalho.

Uma justificativa para explicar a região EST2' é a da ativação de um gene, unicamente na cultivar A-475. Esta condição poderia estar relacionada a um controle genético diferencial na A-475, provavelmente decorrente do esquema de melhoramento ao qual esta cultivar foi submetida até tornar-se um material resistente ao fungo da antracnose. No entanto, para que se possa afirmar que a zona EST2' seja na verdade produto de um outro loco, torna-se necessária a condução de estudos genéticos adicionais.

Com relação às variações observadas durante o desenvolvimento

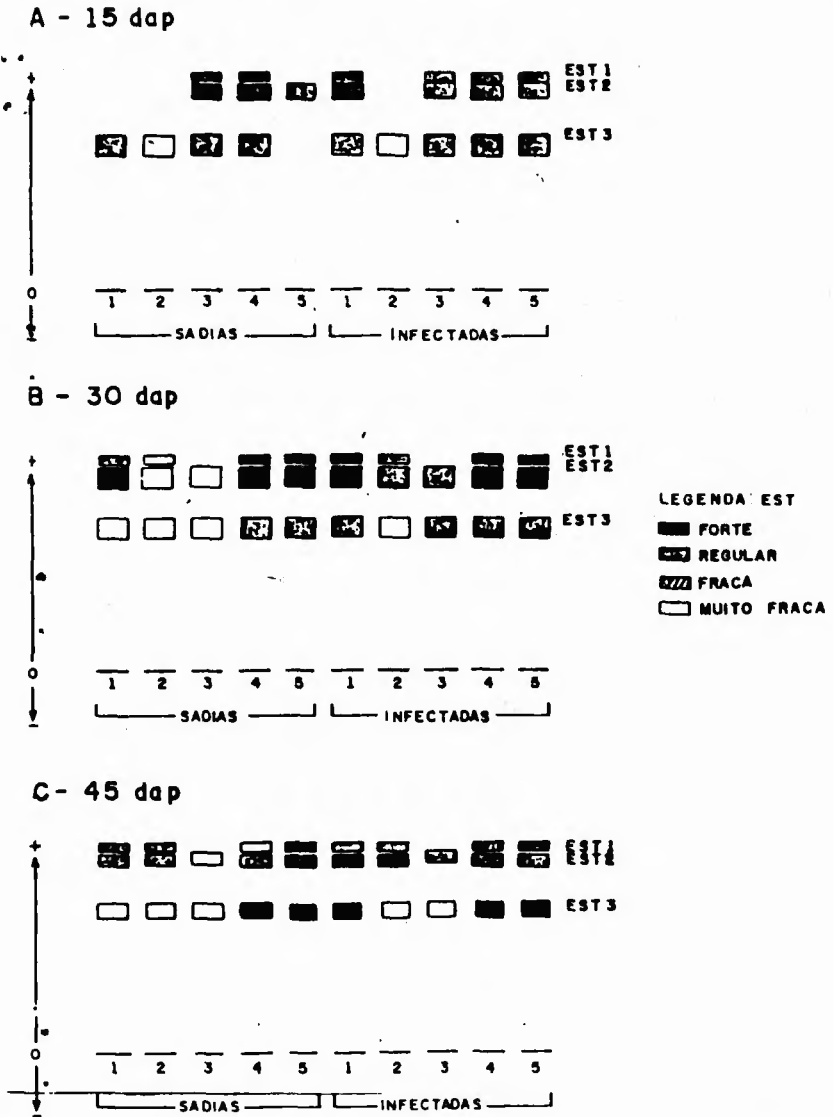


FIGURA 3. Esquema dos perfis eletroforéticos de esterases de raiz, detectadas em tecidos sadios e infectados das cultivares IPA 74-19 (1), Michelite (2), A-475 (3), AB 136 (4), e Cornel 49242 (5). A - material coletado aos 15 dap, B - material coletado aos 30 dap, C - material coletado aos 45 dap. Migração nos sentidos indicados.

ontogenético, expressas como aparecimento de regiões em determinada fase desaparecimento em outra (s) ou, ainda, como diferenciações nos graus de intensidade de coloração das regiões em distintas fases da ontogenese, é de se ressaltar que tais variações devem refletir diferenciações celulares, morfológicas e/ou fisiológicas (Redei, citado por Falcão, 1984), e são úteis quando se quer caracterizar eletroforeticamente as cultivares.

Os padrões esterásicos para tecido de caule, aos 15 dap, foram utilizados para distinguir entre si as cultivares resistentes A-475, AB 136 e Cornel 49242, ou seja, foram úteis para a caracterização das mesmas. Outro exemplo está nos padrões obtidos para folhas aos 15 e 45 dap. Para a identificação das cultivares suscetíveis IPA 74-19 e Michelite são citados os padrões obtidos para tecido infectado de folha, aos 15 dap, e para tecido sadio de raiz, aos 30 dap.

CONCLUSÕES

- a) - Tecidos de folha, caule e raiz podem ser utilizados para a análise comparativa de padrões esterásicos de cultivares de feijão, com vistas à caracterização das mesmas, sendo os melhores folha e caule, uma vez que nestes tecidos pode ser observado um maior número de regiões;
- b) - Na caracterização de cultivares, quando não é possível estudar um grande número de sistemas protéicos, é importante a análise do material em diferentes fases do desenvolvimento ontogenético. Isto porque um maior número de regiões pode ser revelado e, com isto, aumentar a chance de diferenciar as cultivares entre si;
- c) - A região EST2 se constitui em um marcador eletroforético para a cultivar A-475 e pode ser utilizado em programas básicos de Genética;
- d) - As diferenças observadas nos padrões esterásicos para tecidos sadios e infectados, considerando as 5 cultivares estudadas, não estabelecem uma relação clara para com o binômio resistência x suscetibilidade. Isto pode significar que as esterases não sejam importantes para a distinção de cultivares de feijão resistentes à antracnose.

ABSTRACT

Esterasic patterns of leaf, stem and root obtained for 15, 30 and 45 days after the planting were studied for five bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) resistant (A- 475, AB 136 and CORNEL 49242) and susceptible (IPA 74-19 and MICHELITE) to the anthracnose fungus. The difference observed at the esterasic patterns for healthy tissues and for inoculated tissues were not sufficient to establish a relation between the esterasic patterns and the cultivar resistance or susceptibility behaviour. However, through the esterasic profiles, it was possible to characterize each one of the five cultivars.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FALCÃO, T. M. M. de A. **Polimorfismo protéico em populações naturais de abelhas brasileiras**. Ribeirão Preto, 1984. 231 p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1984.
2. FUNAKOSHI, S.; DEUTSCH, H. E. Human carbonic anhidrasas. II. Some physicochemical properties of native isozymes and similar isozymes generated "in vitro". **Journal Biological Chemistry**, v. 244, p. 3438-3445, 1969.
3. HARRIS, H. *The principles of Human Biochemical Genetics*. Elsevier North-Holland, New York, 544p., 1966.
4. HOWARD, F. ; SCHWARTZ, Y. G. e GALVEZ, E. **Problemas de produccion del frijol**. Cali: Colombia, CIAT, 623P., 1983.
5. KIMATI, H. Doenças do feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. In: *Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas*. Vól. II. Col. Agron. Ceres. São Paulo, p. 297 - 318, 1980.
6. MARTINS, M. C. P. Heterogeneidade de amostra de sementes comerciais do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) às raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Mag.) Scrib.) e de *Uromyces phaseolivar, typica*. Viçosa, 1978. 104 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, 1978.
7. MESSEGUER, R.; ARUS, P. Electrophoretic identification of cannatros cultivars. **Hortscience**, v. 20, p. 372-373, 1985.
8. MIDELFORT, C. F. ; MEHLER, A. H. Deamination *in vivo* of an asparagine residue of rabbit muscle aldolase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 69, p. 1816-1819, 1972.
9. MIRANDA, P.; COSTA, A. F. da.; PIMENTEL, M. de L.. et al. **Introdução avaliação e utilização de germosplasma de feijão**. Recife : IPA, 1983. p. 30-41: Programa feijão, relatório anual de pesquisa, 1983.
10. OLIVEIRA, E. A. **Controle genético de enzimas peroxidase e catecol oxidase em *Phaseolus vulgaris* L. e suas relações com *Uromyces phaseoli* (Reb.) Wint. *Typica Arth***. Porto Alegre, 1977. 151 p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1977.

11. PIO RIBEIRO, G. ; CHAVES, G. M. **Raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib que ocorrem em alguns municípios de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro.** Viçosa, 1975. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, 1975.
12. SANTOS, R. C. dos; FALCÃO, T. M. M. de A. Influência de três métodos de extração de proteínas em três cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 5. , 1986, Recife. *Anal...* Recife : s. n. , 1986. p. 66.
13. SCANDALIOS, J. G. Genetic control of multiple molecular forms of enzyme in plants: A review. *Biochem. Genet.*, v. 3, p. 37-79, 1969.
14. SCHWENNESEN, J.; MIELKE, E. A. ; WOLF, W. H. Identification of seedles tables grape cultivars and a bud sport with berry isozymes. *Hortscience*, v. 17, p. 366-368, 1982.
15. SHAW, M. The physiology and host parasite relations of rusts. *Annual Review Phytopathology*, v. 1, p. 259-294, 1963.
16. TAVARES, S. C. H. **Variabilidade de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib e fontes de resistência de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) às raças encontradas em municípios do Estado de Pernambuco.** Recife, 1986, 104 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1986.

Recebido para publicação em 26/07/95