

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ANÁLISE  
DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM ESTRESSE  
OXIDATIVO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA VASSOURA-  
DE-BRUXA EM CACAUEIRO**

**CRISTIANO VILLELA DIAS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Março de 2007**

D541

Dias, Cristiano Villela.

Quantificação de ácidos orgânicos e análise de expressão de genes relacionados com estresse oxidativo durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa em cacauero / Cristiano Villela Dias. - Ilhéus: UESC, 2007.

xii, 89f. : il. ; anexos.

Orientador: Júlio Cezar de Mattos Cascardo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 3. Estresse oxidativo.  
3. Oxalato de Cálcio. 4. Cacau – Melhoramento genético.  
I. Título.

CDD 632.4

**CRISTIANO VILLELA DIAS**

**QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ANÁLISE  
DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM ESTRESSE  
OXIDATIVO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA VASSOURA-  
DE-BRUXA EM CACAUEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Março de 2007**

CRISTIANO VILLELA DIAS

QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E ANÁLISE DE EXPRESSÃO  
DE GENES RELACIONADOS COM ESTRESSE OXIDATIVO DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DA VASSOURA-DE-BRUXA EM CACAUEIRO

**Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Santa Cruz, como parte das  
exigências para obtenção do título de  
Mestre em Genética e Biologia Molecular.**

Aprovada: 27 de março de 2007

---

Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira  
UESC

---

Prof. Dr. Antonio Figueira  
CENA/USP

---

Dra. Karina Peres Gramacho  
CEPEC/CEPLAC

---

Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo  
UESC – Orientador

**Ofereço,**

Aos meus pais, pelo esforço e sacrifício que me permitiram alcançar meus sonhos.

**Dedico,**

Aos amores da minha vida: minha companheira Ana July, pelo entusiasmo com que sempre me apoiou e incentivou; e ao meu filho Gabriel, pelas alegrias que me proporciona.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC-BA) e à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelas condições oferecidas;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa;

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto;

Ao Professor Júlio César de Mattos Cascardo, não só pela orientação, mas principalmente pela amizade;

À Mars Symbio Sciences, na pessoa de John Hammerstone, pelos ensinamentos em cromatografia e pelo empréstimo de materiais e reagentes utilizados neste trabalho;

Aos Alunos de iniciação científica Juliano e Anderson, pela ajuda e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À Pesquisadora Karina Peres Gramacho, pela disposição e contribuição na viabilização dos experimentos de inoculação;

À Pesquisadora do CIRAD Fabiene Micheli, pela atenção e simpatia com que sempre me recebeu para esclarecer minhas dúvidas;

Ao Professor Abelmon da Silva Gesteira, pela colaboração e ajuda;

Ao Robson, pelo trabalho desenvolvido no laboratório no processo de seqüenciamento que permitiu o desenvolvimento deste trabalho;

Aos Professores Carlos Priminho Pirovani, Aristóteles Góes Neto, Cássio van Den Berg, por contribuírem para o meu crescimento científico;

À Dahyana, pela disposição e contribuição no cotidiano do laboratório;

Ao Eduardo S.Guedes, pela amizade e por suportar meus dias de lamúria;

Aos amigos Stênio e Heliana, e seu filho, Steninho, pelos dias agradáveis que compartilhamos e por me acolherem em sua casa em momentos de necessidade;

Aos amigos Braz e Maiza, pelo auxílio indispensável à realização desse trabalho e principalmente pela amizade;

Aos amigos Wagner e Tharcilla, pela amizade e agradável convivência;

À Vânia, pelo auxílio na preparação dos experimentos de microscopia;

Aos amigos do programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, Fabrício, Marcelo, Jeiza, Claudine, Ana Cássia, Adriana, Sizenando, Carol, Vanderly, Sônia e Jamile, pelo coleguismo e pela amizade;

Ao René Silvio, pela amizade e ajuda que possibilitaram minha permanência na UESC;

Aos funcionários das secretarias do Programa de Pós-Graduação (Andréa e Luciana) e do Departamento (Geysa e Antônio), pela prestatividade;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram em mais esta importante etapa da minha vida, meu muito obrigado.

## ÍNDICE

<b>EXTRATO</b> .....	VII
<b>ABSTRACT</b> .....	IX
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	XI
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1. O patossistema <i>Theobroma cacao</i> - <i>Moniliophthora perniciosa</i> .....	15
2.2. Estresse oxidativo .....	16
2.3. Produção de Espécies ativas de oxigênio em plantas. ....	18
2.4. Mecanismos de detoxificação de espécies ativas de oxigênio em plantas .....	19
2.5. Metabolismo do oxalato.....	22
2.6. Síntese de oxalato em plantas. ....	25
<b>3. Capítulo 1: Quantificação cromatográfica de ácidos orgânicos durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa</b> .....	28
Resumo .....	28
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>3.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.2.1. Material vegetal.....	31
3.2.2. Análise de ácidos orgânicos por HPLC. ....	32
3.2.3. Detecção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pelo método de coloração com DAB.....	32
3.2.4. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas no acúmulo de ácido oxálico livre em uma variedade suscetível de <i>Theobroma cacao</i> . ....	33
<b>3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33

3.3.1. Quantificação de ácido oxálico e ascórbico livres durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa. ....	33
3.3.1.1. Determinação dos níveis de OxA durante a doença em variedades de <i>T. cacao</i> .....	35
3.3.1.2. Determinação dos níveis de AsA durante a doença em variedades de <i>T. cacao</i> .....	37
3.3.2. Avaliação do perfil cromatográfico para ácidos orgânicos nas variedades suscetível e resistente de <i>T. cacao</i> durante a infecção por <i>M. pernicioso</i> . ....	40
3.3.3. Produção de peróxido de hidrogênio nos primeiros estágios da doença. ....	43
3.3.4. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas no acúmulo de ácido oxálico livre em variedades suscetíveis de <i>Theobroma cacao</i> . ....	48
<b>3.5. CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>3.6 .REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	51
<b>4. Capítulo 2: Análise da expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo em <i>Theobroma cacao</i> por macroarranjo de dna</b> .....	54
Resumo .....	54
<b>4.1. INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>4.2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
4.2.1. Construção do macroarranjo de DNA .....	57
4.2.2. Material vegetal. ....	58
4.2.3. Extração de RNA.....	59
4.2.4. Purificação do RNA .....	60
4.2.5. Amplificação linear do mRNA (transcrição <i>in vitro</i> ). ....	61
4.2.5.1. Síntese da primeira fita.....	61
4.2.5.2. Síntese da segunda fita.....	61
4.2.5.3. Purificação do cDNA fita dupla.....	62
4.2.5.4. Transcrição <i>in vitro</i> utilizando o kit da Promega (Ribo MAX ®):.....	62
4.2.5.5. Purificação do aRNA .....	62
4.2.5.6. Segunda etapa de amplificação .....	63
4.2.6. Marcação da sonda e hibridização .....	63
4.2.6. 1. Preparação da sonda marcada .....	63
4.2.6. 2. Hibridização.....	64
4.2.7. Geração do sinal e detecção.....	64

4.2.8. Captura dos dados e normalização.....	65
<b>4. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
4.3.1. Hibridização das membranas de náilon com cDNAs marcados.....	66
4.3.2. Avaliação da qualidade da normalização .....	67
4.3.3. Genes diferencialmente expressos. ....	71
<b>4.4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>78</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>80</b>
<b>7.0 ANEXOS .....</b>	<b>87</b>

## EXTRATO

VILLELA-DIAS, Cristiano, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2007. **Genômica da interação *Theobroma cacao* / *Moniliophthora perniciosa*: Análise da expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e sua relação com resistência e, ou suscetibilidade.** Orientador: Júlio César de Mattos Cascardo. Co-orientadora: Fabienne Micheli. Colaboradores: Karina P. Gramacho e Abelmon da Silva Gesteira.

O aumento rápido dos níveis de espécies ativas de oxigênio (EAO) é denominado de explosão oxidativa e se constitui uma das respostas mais rápidas ao ataque por patógenos. A formação dessas moléculas é resultante de vias metabólicas como as da fotorrespiração, do aparato fotossintético e da respiração mitocondrial. A elevação dos níveis de EAO pode ser danosa para célula, mas por outro lado pode atuar na ativação de vias metabólicas de defesa ou de resposta a estresses. Desta forma, EAO podem ser vistas como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinal de resposta a estresses. Nesse trabalho os níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uma das principais moléculas envolvidas no estresse oxidativo, foram avaliados em uma variedade resistente e outra suscetível à vassoura-de-bruxa, a principal doença das lavouras cacaeiras do Brasil, durante os primeiros estágios da doença. Variações dos níveis de ácido oxálico (OxA) e ácido ascórbico (AsA) foram quantificadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) na tentativa de verificar o envolvimento dessas moléculas na formação de cristais de oxalato de cálcio durante o desenvolvimento da doença. A expressão de alguns genes possivelmente envolvidos com o estresse oxidativo e homeostase de cálcio

foi avaliada por macroarranjo de DNA em membrana de náilon. Demonstrou-se que as variedades resistente e suscetível possuem um padrão de formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bem diferenciado e que o aumento dos níveis de AsA na variedade suscetível pode ser correlacionado com o aumento dos cristais de oxalato de cálcio descrito para variedade suscetível durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa. Pelas análises de expressão diferencial de genes, foram identificadas seqüências diferencialmente expressas, sendo ativadas algumas envolvidas no processo de clorespiração (respiração dos cloroplastos) e formação de EAO, e reprimidas outras envolvidas na fosforilação oxidativa mitocondrial. Os resultados obtidos são relevantes na medida em que contribuem para o aprofundamento do entendimento acerca da interação entre *Moniliophthora perniciosa* e *Theobroma cacao*.

Palavra-chave: Estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio, *Moniliophthora perniciosa*, oxalato de cálcio.

## ABSTRACT

VILLELA-DIAS, Cristiano, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2007. **Genomics of *Theobroma cacao* / *Moniliophthora perniciosa* interaction: Analysis of gene expression of genes involved on oxidative stress and related to resistance and, or susceptibility.** Advisor: Júlio César de Mattos Cascardo. Co-advisor: Fabienne Micheli. Collaborators: Karina P. Gramacho and Abelmon da Silva Gesteira.

The rapid increase of reactive oxygen species (ROS) is denominated oxidative burst and is one the fastest response to pathogen infection. The main sources of these molecules are the metabolic pathways such as photorespiration, from the photosynthetic apparatus and mitochondrial respiration. The increasing levels of ROS can damage the cells, but, conversely, can act on defense pathways or stress responses. In this way ROS can be considered as cell stress signaling molecules and as secondary messengers involved on stress-response signal transduction pathways. In this work the levels of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), one of the main molecules involved on oxidative stress, were evaluated in a Witches' broom susceptible and resistant cacao varieties, the main disease for cacao in Brazil, during the initial stages of the disease. Variations on oxalic acid (OxA) and ascorbic acid (AsA) levels were quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) in order to verify the involvement of these molecules on calcium oxalate crystals accumulation during disease progression. The expression of some genes possibly involved on oxidative stress and calcium homeostasis was evaluated using DNA arrays on nylon membranes. The results indicated that the cacao varieties have distinct patterns of  $H_2O_2$  accumulation and that the higher

levels of AsA on the susceptible variety can be correlated with increasing numbers of calcium oxalate crystals described previously, during disease progression. Gene expression analyses revealed 12 sequences differentially expressed, with increasing levels of genes involved on chlororespiration process (chloroplast respiration) and generation of ROS and decreasing expression levels genes involved with mitochondrial oxidative phosphorylation. These results contribute somehow to strengthen the knowledge about *Moniliophthora perniciosa* and *Theobroma cacao* interaction.

Key words: Oxidative stress, hydrogen peroxide, *Moniliophthora perniciosa* and calcium oxalate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Ciclo do Ascorbato/glutathiona.....	20
Figura 3.1. Construção da curva padrão.....	34
Figura 3.3. Efeito da indução com <i>M. pernicioso</i> na quantidade de OxA livre em variedades suscetíveis (A) e resistente (B) de <i>T. cacao</i> 72 h após a inoculação.....	36
Figura 3.4. Variação dos níveis de ácido oxálico livre durante o desenvolvimento da doença nas variedades resistente e suscetível.....	36
Figura 3.5. Variação dos níveis de ácido ascórbico livre durante o desenvolvimento da doença nas variedades resistente e suscetível.....	39
Figura 3.6. Efeito da inoculação com <i>M. pernicioso</i> na quantidade de AsA livre em variedades suscetíveis (A) e resistente (B) de <i>T. cacao</i> 72 h após a inoculação. ...	40
Figura 3.7. Cromatograma mostrando as variações dos níveis de OxA e AsA e de um composto desconhecido.....	41
Figura 3.8. Perfil cromatográfico da variedade resistente (A) e suscetível (B) 15 dias após a infecção por <i>M. pernicioso</i> . ..	42
Figura 3.9. Detecção do peróxido de hidrogênio em células da epiderme de <i>T. cacao</i> durante os primeiros estágios do processo de infecção por <i>M. pernicioso</i> em uma variedade resistente (TSH 1188) e outra suscetível ( <i>Catongo</i> ). ..	46
Figura 3.10. Detecção de peróxido de hidrogênio em células adjacentes a um cristal de oxalato de cálcio nas primeiras 24 h após inoculação com <i>M. pernicioso</i> na variedade resistente de <i>Theobroma cacao</i> .. ..	47
Figura 3.11. Variações nas quantidades de ácido oxálico (A) e ascórbico (B) durante o tratamento com duas fontes de nitrogênio diferentes.....	49
Figura 4.1. Microprep dos 96 clones da biblioteca. A figura mostra o padrão de migração para os vetores extraídos dos clones da biblioteca. ....	57
Figura 4.2. PCR das 96 seqüências inseridas nos vetores. ....	58

Figura 4.3. Plântulas de <i>Theobroma cacao</i> : Visão geral da casa de vegetação CEPLAC-Ilhéus-BA (A). Vassoura verde 45 dias após inoculação, apresentado hipertrofia decorrente do desequilíbrio hormonal causado pelo fungo. ....	59
Figura 4.4. Extração de RNA total de <i>Theobroma cacao</i> . ....	60
Figura 4.5. Representação gráfica de uma região da membrana, mostrando a detecção de três <i>spots</i> pelo programa ImageMaster 2D platinum.. ....	65
Figura 4.6 Auto-radiografias dos macro-arranjos contendo os produtos de PCR dos 96 clones da biblioteca de interação.. ....	66
Figura 4.7. Scatter plot com os dados brutos de dois experimentos independentes das hibridizações feitas com a sonda controle (A). Scatter plot do mesmo experimento utilizando os dados da normalização global (B). E da normalização realizada com os coeficientes obtidos dos genes controle (C).....	68
Figura 4.8. Scatter plot com os dados normalizados da membrana marcada com a sonda controle (eixo Y) e infectada (eixo X) após a normalização interespecífica global (A) e após a normalização interespecífica realizada com os coeficientes obtidos dos genes controle (B). ....	70
Figura 4.9. Padrão de expressão dos 89 genes analisados do arranjo. ....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Principais mecanismos envolvidos na produção e detoxificação de espécies ativas de oxigênio em plantas: moléculas alvo e localização subcelular <sup>a</sup> .22	
Tabela 7.1. Tabela mostrando os valores das taxas de expressão de todas as seqüências do macroarranjo, o número de cada clone e o resultado do blast também pode ser visualizado na tabela. ....	87

## 1. INTRODUÇÃO

As culturas agronômicas são atacadas por uma infinidade de patógenos, como vírus, bactérias, fungos e invertebrados. Quando consideramos as monoculturas, a proliferação dessas pragas e doenças pode levar ao surgimento de epidemias devastadoras e promover perdas econômicas consideráveis em decorrência da diminuição da produção ou da qualidade do produto final. Foi o que aconteceu com a produção de cacau do Brasil.

*Theobroma cacao* (L.) é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical, originada da América Central e da Amazônia, e suas amêndoas são a matéria-prima para produção de chocolate. No Brasil, a região sul do estado da Bahia já foi uma das maiores produtoras de cacau do mundo, ficando atrás só da Costa do marfim (PURDY & SCHMIDT, 1996). Em 1989 o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora (= *Crinipellis perniciosa*) foi detectado no estado da Bahia e deu origem a mais devastadora doença agronômica da região: a vassoura-de-bruxa. *Moniliophthora. perniciosa*, um basidiomiceto pertencente a ordem Agaricales e família Tricholomataceae, é um fitopatógeno hemibiotrófico e seus esporos são considerados sua única forma de propagação (EVANS, 1980).

Apartir do seu aparecimento no estado da Bahia vários esforços têm sido empregados no combate e controle da doença pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), que tiveram bons resultados com o desenvolvimento de variedades resistentes. A criação do Projeto Genoma do *M. perniciosa* também foi determinante para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de interação e isso permitiu que atualmente vários pesquisadores se dedicassem na identificação dos mecanismos de resposta

e das substâncias envolvidas nos processos de defesa da planta, mas ainda existem muitas lacunas.

Em plantas uma das mais antigas respostas já descritas para estresses, como a infecção por patógenos, é a alteração no fluxo de íons ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) através da membrana, aumentando o fluxo de cálcio intracelular e levando a um crescimento do cálcio citossólico (FRANCESCHI & NAKATA, 2005). Outra linha de defesa ativada pela planta é a formação de agentes oxidantes (superóxido e peróxido de hidrogênio) que é disparada no ponto de contato com o agente agressor, processo conhecido como explosão oxidativa (MITTLER, 2002). Por outro lado, existem evidências, no caso de fungos necrotróficos, que sugerem que a produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), como resposta à infecção é o fator determinante para colonização (GOVRIN E LEVINE, 2000; MAYER et al., 2001).

Interessantemente, foi observado por Ceita et al. (2007) que durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, em tecidos de *T. cacao* suscetível infectado por *M. pernicioso*, ocorre um aumento do número de cristais de oxalato de cálcio ( $\text{CaOxA}$ ) em paralelo ao desenvolvimento do fungo, seguido por uma elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio, provavelmente resultante da degradação desses cristais. É possível que o aumento do número de  $\text{CaOxA}$  possa estar envolvido na regulação do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ou possa servir como fonte para produção de espécies ativas de oxigênio.

Nesse contexto, nós fomos motivados a investigar a função fisiológica da formação dos cristais de oxalato de cálcio, verificando as variações nos níveis das principais moléculas envolvidas no seu processo de formação, como o ácido ascórbico, recentemente apontado como principal precursor da formação de  $\text{CaOxA}$  em plantas superiores (KEATES et al., 2000), como também verificar as alterações na produção de espécies ativas de oxigênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nos primeiros estágios da infecção, comparando variedades suscetíveis e resistentes de *T. cacao*. A análise de genes, envolvidos em estresse oxidativo e homeostase de cálcio, expressos em tecidos infectados e não infectados também foi realizada, utilizando macroarranjos de DNA em membranas de náilon.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O patossistema *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa*

Uma das principais doenças que afetam a cauaicultura brasileira é conhecida como vassoura-de-bruxa e é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*. Desde 1989, quando foi detectada na Bahia, a principal região produtora do Brasil, e em consequência da falta de medidas de controle e prevenção efetivas, a doença vem sendo responsável pelo declínio da produção, mudanças no uso da terra e sérios danos ao meio ambiente. No sul da Bahia e norte do Espírito Santo grande parte do *Theobroma cacao* (L.) é sombreado por espécies florestais da Mata Atlântica, sistema esse denominado de “cacau-cabruca”. Esse sistema vem contribuindo de forma significativa para a conservação da biodiversidade e dos recursos naturais locais e poder ser considerado um modelo de agricultura tropical sustentável. Essa cultura, mesmo em declínio, possui uma importância sócio-ambiental relevante, o que justifica o empenho dos pesquisadores para tentar entender o desenvolvimento do patógeno e propor estratégias de combate, para que o sistema como um todo se torne economicamente viável e a sua sustentabilidade seja assegurada.

A doença apresenta dois estágios distintos: um biotrófico e um necrotrófico / saprotrófico. No estágio biotrófico o fungo se apresenta na forma de micélio monocariótico, e cresce intercelularmente, causa hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, perda da dominância apical e proliferação de gemas axilares, as quais resultam na formação de ramos anormais chamados de vassoura verde. No estágio saprotrófico, após a morte dos tecidos infectados e formação da vassoura seca, o fungo se desenvolve intracelularmente com micélio na forma dicariótica, possuindo

hifas ligadas por grampos de conexão; posteriormente ocorre a formação do basidiocarpo e liberação dos esporos que darão seguimento ao ciclo de vida do fitopatógeno. (EVANS, 1980; LAWRENCE et al., 1991; SILVA & MATSUOKA, 1999).

Até recentemente os estudos *in vitro* com *M. perniciososa* estavam restritos ao micélio dicariótico, devido à incapacidade de manter o fungo na fase biotrófica, o que só era possível *in vivo*. O desenvolvimento de um meio específico para o crescimento de *M. perniciososa* pôde contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de pesquisas que foquem o metabolismo do fungo na sua fase biotrófica (MEINHARDT et al., 2006). O desenvolvimento do meio só foi possível em decorrência das observações feitas por Scarpari et al. (2005), que verificaram um acúmulo de glicerol durante o desenvolvimento da doença e atribuíram a ele um papel chave na manutenção do fungo na fase biotrófica. A presença do glicerol no meio é imprescindível para manutenção do micélio monocariótico.

Os fungos que possuem duas fases de vida durante o processo de colonização do hospedeiro são chamados de hemibiotróficos e inicialmente mantém vivas as células do hospedeiro, direcionando o metabolismo a seu favor, mas em estágios avançados da doença matam as células e completam seu ciclo de vida, a exemplo de fungos como *Phytophthora*, *Colletotrichum* e *M. perniciososa* (PURDY & SCHMIDT, 1996; WEI et al., 2004; CEITA et al., 2007)

## 2.2. Estresse oxidativo

Espécies ativas de oxigênio (EAO) são continuamente produzidas pelas plantas em decorrência do metabolismo aeróbico e resultam da excitação do  $O_2$  molecular, formando oxigênio molecular simples ( $^1O_2$ ) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para o  $O_2$  levando, respectivamente, à formação de radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou radical hidroxila ( $OH^-$ ).

Contrariamente ao oxigênio molecular essas moléculas podem causar sérios danos a uma variedade de componentes celulares, incluindo danos oxidativos às proteínas, lipídios e DNA. A produção de EAO nas plantas ocorre continuamente como produto de várias vias metabólicas e em diferentes compartimentos celulares (SCANDALIOS, 2005). EAO como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^-$  estão normalmente presentes

nas células em equilíbrio com moléculas anti-oxidantes e sob condições fisiológicas essas moléculas são responsáveis pela detoxificação das espécies de oxigênio reativas. O equilíbrio entre a produção e detoxificação de EAO pode ser perturbado por numerosos fatores ambientais adversos e como resultado desses distúrbios os níveis de EAO podem aumentar rapidamente (MALAN et al., 1990; PRASAD et al., 1994).

As plantas podem gerar EAO em respostas a mudanças ambientais pela ativação de várias oxidases e peroxidases (SCHOPFER et al., 2001; BOLWELL et al., 2002). O aumento rápido dos níveis de EAO é denominado de explosão oxidativa e se constitui uma das respostas mais rápidas ao ataque por patógenos. A formação dessas moléculas é resultante de vias metabólicas como as da fotorrespiração, do aparato fotossintético e da respiração mitocondrial (MITTLER, 2002). O aumento na produção de EAO pode ser danoso para célula, mas por outro lado pode atuar na ativação de vias metabólicas de defesa ou resposta a estresses. (DESIKAN et al., 2001; KNIGHT & KNIGHT, 2001).

Sendo assim, EAO podem ser vistas como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinal de resposta a estresses. E embora níveis basais de EAO possam ser usados para monitorar seu nível de estresse intracelular, esses têm que ser mantidos sob um forte controle, pois níveis extremos podem levar à morte celular (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; MITTLER, 2002). Novas fontes geradoras de EAO foram identificadas nos últimos anos, como as NADHP oxidases, amina oxidase e peroxidases ligadas à membrana. Estas são firmemente reguladas e participam da formação de EAO em processos como a morte celular programada e defesa contra patógenos (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; DAT et al., 2000; GRANT & LOAKE, 2000).

Desta forma, as células das plantas necessitam de pelo menos dois mecanismos diferentes para regular os níveis intracelulares de EAO: um que irá permitir a manutenção de baixos níveis com finalidade de sinalização e outro que irá permitir a detoxificação do excesso, principalmente sob condições de estresse. No entanto, as rotas regulatórias envolvidas no controle desses mecanismos ainda não são conhecidas.

### 2.3. Produção de Espécies ativas de oxigênio em plantas

Várias enzimas estão envolvidas no mecanismo de geração de espécies ativas de oxigênio nas plantas. Muitas delas estão envolvidas no metabolismo normal das plantas como fotossíntese e respiração celular e outras têm sua síntese aumentada durante estresses bióticos e abióticos, como oxidase do glicolato nos peroxissomos durante a fotorespiração (DAT et al., 2000). Recentemente novas fontes de EAO foram identificadas em plantas, incluindo NADPH oxidases, amina oxidases e peroxidases ligadas à parede celular. Essas são fortemente reguladas e participam da produção de espécies ativas de oxigênio durante processos como a morte celular programada e defesa contra o ataque por patógenos. (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; GRANT & LOAKE, 2000) (tabela 2.1).

Adicionalmente à atividade específica de geração de superóxido, descrita para NADPH oxidase por Doke (1983), outros mecanismos de geração de EAO têm sido propostos. A rápida produção de  $H_2O_2$ , disparada pelo ataque por patógenos e tratamento com elicitores, tem sido atribuída à atividade apoplástica de peroxidase da NAD(P)H oxidase (VERA-ESTRELLA et al., 1992). Muitas peroxidases são encontradas no espaço apoplástico e são iônica ou covalentemente ligadas a polímeros da parede celular e podem atuar cataliticamente de duas formas. Na presença de peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos elas participam do ciclo peroxidativo e estão envolvidas com a síntese de lignina e de outros compostos fenólicos. Contudo, se ocorrer um acúmulo de NADPH ou de compostos reduzidos relacionados e diminuição dos fenólicos, inicia-se uma reação em cadeia que fornece as bases para geração de  $H_2O_2$  decorrente da atividade de peroxidase da NADH oxidase (CHEN & SCHOPFER, 1999). A presença de um motivo citoplasmático no qual o cálcio se liga a NADPH oxidases em plantas, sugere a possibilidade da regulação direta de sua atividade, através da percepção de flutuações subcelulares dos níveis de cálcio (ALLAN & FLUHR, 1997). Vários sistemas de geração e detoxificação de EAO são dependentes de cálcio e dessa forma as oscilações dos níveis de cálcio e a formação e ou detoxificação de EAO podem estar intimamente relacionadas e podemos, então, especular que EAO e cálcio são mensageiros intercomunicantes em vários processos celulares (GORDEEVA et al., 2003).

Estudos *in vitro* também têm sugerido uma outra atividade para NADPH oxidase: geração de radicais hidroxila (OH<sup>·</sup>). De forma similar à reação de Haber-Weiss ( $H^2O^2 + O_2^- \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$ ), peroxidases foram capazes de reduzir peróxido de hidrogênio a radicais hidroxila (CHEN & SCHOPFER, 1999). Contrariamente, ao seu poder de causar danos às células vegetais e isso incluem danos genéticos, a produção de OH<sup>·</sup> por peroxidases ligadas à parede celular pode, por outro lado, ser relevante para outras respostas fisiológicas como a quebra controlada de polímeros estruturais durante o rearranjo da parede em células meristemáticas (VIANELLO & MACRI, 1991; OGAWA et al., 1997; FRAHRY & SCHOPFER, 2001). No entanto, por serem altamente reativos, possuindo um alto grau de afinidade por biomoléculas diretamente no seu sítio de produção e terem meia-vida curta (<1μs), são muito difíceis de serem estudados (APEL & HIRT, 2004).

Desta forma, mesmo sendo tóxicos EAO também participam de mecanismos de sinalização celular e por isso as plantas necessitam de mecanismos extremamente eficientes para manter os níveis basais para propósito de sinalização e para detoxificar o excesso, especialmente sob estresse ambiental e ataque por patógenos. (DAT et al., 2000).

#### **2.4. Mecanismos de detoxificação de EAO em plantas**

As principais moléculas antioxidantes presentes nas plantas são ascorbato (ASC) e glutathiona (GSH), assim como tocoferol, flavonóides, alcalóides e carotenóides. Foi demonstrado que mutantes com diminuição dos ascorbato (CONKLIN et al., 1996) e alteração nos de GSH (CREISSEN et al., 1999) apresentaram uma maior susceptibilidade ao estresses. Contrariamente, Bart et al. (2004) mostraram que mutantes deficientes para síntese de ascorbato foram mais resistentes à infecção por patógeno que as variedades selvagens.

Enquanto a glutathiona é oxidada pelas EAO formando glutathiona oxidada (GSSG), o ascorbato é oxidado a monodehidroascorbato (MDA) e dehidroascorbato (DHA). E através do ciclo do ascorbato-glutathiona, GSSG, MDA e DHA podem ser reduzidos a glutathiona e ascorbato (Figura 2.1). E em resposta a estresses abióticos e bióticos as plantas são capazes de aumentar os níveis de glutathiona (VANACKER et al., 2000) e ascorbato (CEITA et al., 2007).

As formas reduzidas desses antioxidantes são mantidas nas células pela Glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDAR) e dehidroascorbato redutase (DHAR). Pouco se sabe sobre envolvimento dos flavonóides e carotenoides no processo de detoxificação de EAO em plantas. Contudo, a superexpressão da hidroxilase do  $\beta$ -caroteno em *Arabidopsis* foi correlacionada a altas taxas de xantofilas nos cloroplastos e resultou no aumento da tolerância ao estresse oxidativo gerado pelo aumento da luminosidade (DANGL & JONES, 2001).

As principais enzimas envolvidas nos mecanismos de detoxificação de EAO nas plantas são superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), e catalase (CAT) (tabela 1) (SCANDALIOS, 2005). Nas células vegetais o balanço entre SOD e APX ou CAT é essencial para manter o estado constante dos níveis de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (BOWLER et al., 1991). APX é apontada como sendo responsável pela modulação das EAO envolvidas nos processos de sinalização enquanto a CAT participa ativamente da remoção do excesso  $H_2O_2$  durante condições de estresse. A descoberta que o ciclo do ascorbato-glutathione (Figura 2.1) está presente em quase todos os compartimentos celulares investigados até o momento, como também a alta afinidade da APX pelo  $H_2O_2$ , sugere que este ciclo desempenha uma função crucial no controle dos níveis de EAO nesses compartimentos (MITTLER, 2002).

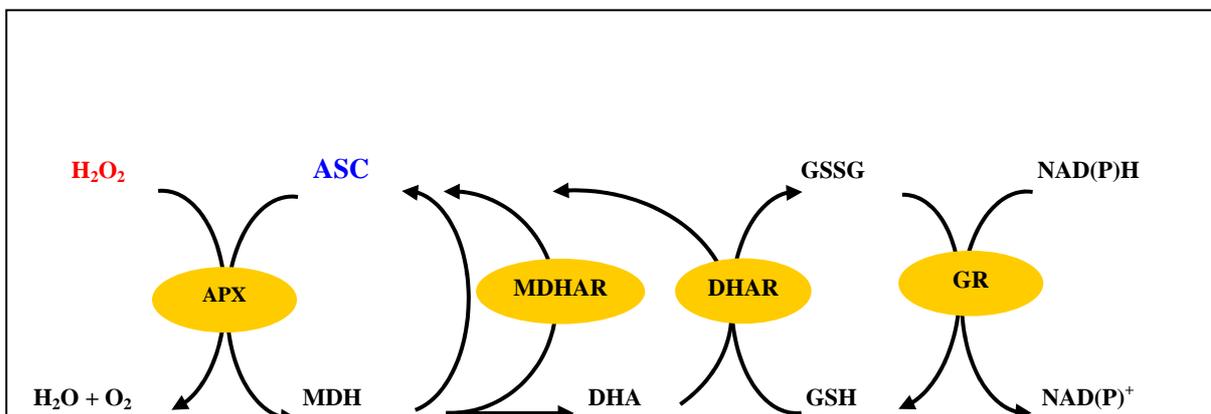


Figura 2.1. Ciclo do Ascorbato/glutathione. O ascorbato (ASC) é oxidado a monodehidroascorbato (MDH) pela ação da ascorbato peroxidase (APX) consumindo  $H_2O_2$ . A MDH redutase (MDHAR) reduz MDH em ascorbato com a ajuda de NAD(P)H. Dehidroascorbato (DHA) é gerado espontaneamente a partir do MDA e pode ser convertido a ascorbato pela ação da DHA redutase (DHAR) com a ajuda da glutathione (GSH) que é

oxidada a sua forma reduzida (GSSG). O ciclo é fechado pela GSH redutase que converte GSSG em GSH com ajuda do agente redutor NAD(P)H.

A pesar da CAT estar presente nos peroxissomas e glioxissomas não é restrita apenas a estes compartimentos (SCANDALIOS, 2005). Sua ação é indispensável para detoxificação do  $H_2O_2$  durante situações de estresse, como foi demonstrado pela proliferação de peroxissomas durante situação de estresse (LOPEZ-HUERTAS et al., 2000) As catalases, diferentemente de outras enzimas que participam do processo de remoção de moléculas oxidantes, não necessitam de equivalentes redutores para desempenhar sua atividade o que as tornam insensíveis ao estado oxidativo e lhe permite remover, eficientemente, o excesso de  $H_2O_2$  da célula. Elas podem ser agrupadas em três classes; as da primeira removem o excesso de  $H_2O_2$  produzido em tecidos fotossintéticos durante a fotorrespiração; as da segunda estão presentes em tecidos vasculares e são relacionadas ao processo de lignificação da parede celular e as da terceira são encontradas abundantemente em sementes e plantas jovens e são relacionadas à detoxificação do excesso de  $H_2O_2$  gerado pela degradação dos ácidos graxos nos glioxissomas (BREUSEGEM et al., 2001). Dependendo da concentração de  $H_2O_2$  ela pode exercer duas funções. Em baixa concentração de  $H_2O_2$  ( $<1\mu M$ ), ela atua peroxidando uma variedade de moléculas doadoras de hidrogênio (ex: etanol, ácido ascórbico) da seguinte maneira:  $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$ . Quando a concentração de  $H_2O_2$  se torna alta ela o decompõe rapidamente usando a molécula como doadora e aceptora de hidrogênio:  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$  (SCANDALIOS, 2005).

Plantas de *Nicotiniana tabacum* que tiveram a expressão da CAT suprimida apresentaram um aumento nos níveis de EAO em resposta ao estresse causado tanto por agentes bióticos como abióticos (WILLEKENS et al., 1997). Desta forma, CAT pode ser considerada uma enzima indispensável para o processo de tolerância ao estresse oxidativo em plantas. Por outro lado, alguns fungos podem secretar catalases nos tecidos infectados como estratégia enzimática de defesa contra  $H_2O_2$  produzido pelo hospedeiro (GARRE et al., 1998).

Tabela 2.1. Principais mecanismos envolvidos na produção e detoxificação de espécies ativas de oxigênio em plantas: moléculas alvo e localização subcelular <sup>a</sup>.

Mecanismo	Numero EC ou referência:	localização	Moléculas alvo
<b>Produção</b>			
Glicolato oxidase	EC:1.1.3.15	Per	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
NADPH oxidase	(GRANT & LOAKE, 2000)	Mpa	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Oxalato oxidase	EC 1.2.3.4	Apo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Xantina oxidase	(CORPAS et al., 2001)	Per	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Amina oxidase	EC 1.5.3.11	Apo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
NADH peroxidase	EC 1.11.1.1	Pac	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
<b>Detoxificação</b>			
Superóxido dismutase	EC 1.15.1.1	Clo, Cit, Mit, Per e Apo	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Ascorbato peroxidase	EC 1.11.1.11	Clo, Cit, Mit, Per e Apo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Catalase	EC 1.11.1.6	Per, Cit, Mit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Peroxidases (não específicas)	EC 1.11.1._	Pac	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Glutationa peroxidase	EC 1.11.1.9	Cit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ROOH
Tioredoxina peroxidase	EC 1.11.1.7	Clo, Cit e Mit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<sup>a</sup> Abreviações: Per, peroxissoma; Mpa, membrana plasmática; Apo, apoplasto; Pac, parede celular; Clo, cloroplasto; Cit, citosol; Mit, mitocôndria; Vac, vacúolo.			

## 2.5. Metabolismo do oxalato

O ácido oxálico que tem sido detectado em vários organismos incluindo animais, fungos e plantas é um dos mais fortes ácidos orgânicos com valores de pKa 1.3 e 4.3 (LANE, 1994). Em plantas ele pode ocorrer como ácido livre, mas é mais comum encontrá-lo na forma de sais solúveis como os de sódio e potássio ou insolúveis como o de cálcio formando cristais de oxalato de cálcio (CaOxA). A ocorrência e distribuição do oxalato pode variar entre os órgãos da mesma planta, sendo mais comum nas folhas do que nas raízes. Variações nas quantidades de oxalato podem ser observadas em decorrência de diversos fatores como idade da planta, estação do ano, clima, tipo de solo e infecção por patógeno (SRIVASTAVA & KRISHNAN, 1959; CEITA et al., 2007).

Apesar de sua fórmula simples, o ácido oxálico ( $C_2H_2O_4$ ) pode agir como fonte de prótons e elétrons e como um forte quelante de metais e devido a sua múltipla natureza química é utilizado em uma infinidade de processos como biorremediação de poluentes orgânicos, sistema de biodegradação de lignina, detoxificação de alumínio e como doador de elétron na fixação de nitrogênio em rizóbios simbióticos em leguminosas (MUNIR et al., 2001). Muitas espécies de plantas, incluindo plantas cultiváveis, são capazes de acumular oxalato na ordem de 3 a 80% de suas massas secas e muitos estudos têm demonstrado que ele pode desempenhar várias funções na planta, incluindo regulação da quantidade de cálcio livre, balanço iônico (ex.: K e Na), defesa, sustentação tecidual e detoxificação de metais pesados (LIBERT & FRANCESCHI, 1987; LIU et al., 2002; EVANS et al., 2003; FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

Está bem estabelecido que plantas são capazes de metabolizar oxalato observando flutuações em sua concentração e que uma das principais funções da formação de cristais de  $CaOx_A$  nas plantas inclui a regulação da quantidade de cálcio livre (FRANCESCHI & HORNER, 1980; FRANCESCHI & NAKATA, 2005). A rápida indução da formação de cristais de oxalato de cálcio em plantas de *Lemma* sugere que eles podem servir como estoque de onde o cálcio pode ser retirado quando necessário (HEPLER & WAYNE, 1985). A observação de que em algumas plantas em condições de deficiência de cálcio ocorre solubilização desses cristais, presumivelmente para fornecer cálcio para o crescimento e manutenção celular, dão suporte a essa tese (FRANCESCHI, 1989).

O cálcio é necessário para ativação e/ou estabilização de muitas enzimas; as células das plantas necessitam de  $Ca^{2+}$  para liberar peroxidases que estão envolvidas no controle da alongação celular como também no processo enrijecimento da parede celular em decorrência de sua atividade de ligação cruzada e habilidade em participar na formação da lignina (STICHER et al., 1981). Uma das principais funções do cálcio nas células das plantas é sua ação na formação da lamela média onde o íon  $Ca^{2+}$  participa da estabilização de pontes iônicas entre as cadeias de pectina. E embora os cristais de  $CaOx_A$  tenham sido descritos como uma forma de detoxificar ácido oxálico livre o fato é que muitas plantas são capazes de manter altas concentrações de ácido oxálico solúvel e livre dentro de seus vacúolos (RAVEN & SMITH, 1976).

Existem inúmeros trabalhos bioquímicos e fisiológicos que abordam a produção de CaOxA como um mecanismo de alto desempenho na regulação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  nos órgãos e tecidos da planta, sendo necessário em plantas que crescem em ambientes onde ocorre abundância de cálcio solúvel e ambientes de restrição onde a absorção por parte das raiz é pobre (FRANCESCHI, 1989; VOLK et al., 2002).

Enquanto que em soja a deposição de CaOxA ocorre em tecidos maduros, algumas plantas são capazes de promover esse acúmulo em tecidos em desenvolvimento. Regiões meristemáticas e células em desenvolvimento geralmente não possuem vacúolos ou quando estão presentes são muito reduzidos, desta forma apresentam uma capacidade de compartimentalização intracelular bastante reduzida. O íon cálcio possui uma grande capacidade de ligação com a parede celular, mas o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  no apoplasto das células jovens em desenvolvimento pode interferir no processo de expansão celular pela ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a resíduos ácidos de polímeros da parede celular. Deste modo, a função primária da formação de CaOxA em tecidos em desenvolvimento tem o papel de reduzir os níveis de cálcio do apoplasto das células adjacentes, servindo como um reservatório forte e especializado de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitindo com que as células se desenvolvam normalmente. Alguns trabalhos que sustentam esta argumentação têm demonstrado que o aumento do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  na solução nutritiva aumenta o número de cristais (FRANCESCHI, 1989; VOLK et al., 2002; MAZEN et al., 2004; FRANCESCHI & NAKATA, 2005; VOLKOV et al., 2006). Evidências adicionais sobre a função do CaOxA na regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  livre são fornecidas pelo desaparecimento de alguns cristais sob condições de deficiência de cálcio (FRANCESCHI, 1989; VOLK et al., 2002).

Usando anticorpo para oxalato oxidase (EC: 1. 2. 3. 4), enzima envolvida no processo de degradação do ácido oxálico e conversão para  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Volk et al. (2002) levantam a possibilidade do seu envolvimento no processo de degradação do ácido oxálico proveniente da dissolução dos cristais de CaOxA nos vacúolos dos idioblastos. A proteína estava presente em condições de crescimento com limitação da quantidade de cálcio, mas estava ausente em condições de maior disponibilidade. Apesar da existência de vários trabalhos ilustrando a função do CaOxA no processo de regulação da quantidade de cálcio livre em plantas não

podemos deixar de considerar outras possibilidades com relação a funcionalidade de sua formação e/ou dissolução. A superexpressão de um gene de trigo, codificando para síntese de uma oxalato oxidase, em girassol disparou a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e respostas de defesa por parte da planta (DAVLETOVA et al., 2005). Outros trabalhos também demonstram o envolvimento da oxalato oxidase na redução da progressão de algumas doenças fúngicas, conferindo em alguns casos resistência parcial sob condições de cultivo (COBER et al., 2003; MORI et al., 2003)

Ceita et al. (2007) demonstrou que durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, em tecidos de *T. cacao* suscetível infectado por *M. perniciosa*, ocorre um aumento do número de CaOxA em paralelo ao desenvolvimento do fungo seguido por uma elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio, possivelmente resultante da degradação desses cristais e que, contrariamente, favorece o desenvolvimento do patógeno. Já foi mostrado que a oxalato oxidase de trigo (*Triticum aestivum*) e de cevada (*Hordeum vulgare*) pertencem à família de proteínas das *germin* e que foram primeiramente descritas como estando envolvidas no processo de defesa das plantas por Lane et al. (1986). Desta forma a participação do CaOxA na biologia das plantas superiores, principalmente no que diz respeito a sua função nas interações planta-patógeno ainda permanece controversa.

## 2.6. Síntese de oxalato em plantas

Existem inúmeras vias metabólicas possíveis para síntese do ácido oxálico descritas para plantas (FRANCESCHI & NAKATA, 2005). Inúmeros trabalhos foram realizados na tentativa de elucidar a via metabólica do ácido oxálico e de reduzir os níveis de oxalato em plantas cultiváveis (LIBERT & FRANCESCHI, 1987)

A oxidação fotorespiratória do glicolato e glioxilato tem sido proposta como uma importante via de formação de oxalato em plantas (FUJII et al., 1993; NAKATA, 2003; FRANCESCHI & NAKATA, 2005). Esta proposta é baseada na observação de que a oxidase do glicolato (GLO) foi capaz de catalizar a oxidação do glicolato para oxalato.

No entanto, existem evidências que são contrárias a esta via metabólica. Raven et al (1982), mostrou que a incorporação do <sup>18</sup>O<sub>2</sub> no glicolato não é transferida para o oxalato. E plantas que apresentam menor fotorespiração (C4) continuam acumulando oxalato a altas concentrações (LIBERT & FRANCESCHI,

1987; LIU et al., 2002) A produção de oxalato em plantas também é atribuída à ação da isocitrato liase sobre o isocitrato (GIACHETTI et al., 1987), porém essa via é considerada minoritária (FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

A participação do ácido ascórbico (AsA) na formação do oxalato foi proposta muito tempo atrás por Wagner e Loewus (1973) e desde então tem estimulado o interesse dos pesquisadores no estudo do metabolismo do AsA e sua relação com a formação do ácido oxálico (OxA) nas plantas. A abundância de ácido ascórbico e sua distribuição nos tecidos verdes e não verdes da planta, o que é compatível com a distribuição do OxA, faz dele um dos melhores substratos para formação de oxalato. E quando consideramos a síntese do OxA é importante ressaltar que as plantas podem acumular grandes quantidades de oxalato solúvel e ou insolúvel, na forma de CaOxA, e a modo como se dá esse acúmulo não é necessariamente o mesmo (SMIRNOFF & WHEELER, 2000; SMIRNOFF, 2001; FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

Keates et al. (2000), usando ácido ascórbico, ácido oxálico, ácido eritroascórbico e galactose ou glicolato, marcados com  $^{14}\text{C}$ , demonstrou que o AsA possui uma função importante como precursor do OxA e do CaOxA em idioblastos de *Pistia stratiotes* e que o glicolato é um substrato muito pobre para síntese de OxA e formação de CaOxA. O trabalho corroborou as descobertas de Wheeler, Jones e Smirnoff (1998), confirmando que a L-galactose é um intermediário chave na conversão da D-glicose para AsA nas plantas. Por outro lado, as micro-autoradiografias feitas pela autora mostraram que ocorre incorporação do carbono marcado do OxA em outros componentes celulares das células em crescimento, mostrando um acúmulo nas regiões meristemáticas. Isso vai de encontro ao dogma proposto por Franceschi e Horner (1980) de que OxA é um produto final do metabolismo com poucas possibilidades de reentrada no ciclo do carbono das plantas.

Simpson e Ortwerth (2000), apresentaram dados esclarecedores do processo de conversão do AsA para oxalato. Os autores demonstram *in vitro*, que o L-dehidroascorbato (DHA) e o 2,3-L-diketogulonato (2,3-DKG), produtos da oxidação do AsA, são capazes de levar à formação de oxalato em condições oxidativas e sem a participação enzimática no processo. O DHA hidrolisa rapidamente em soluções a pH 7.0 formando 2,3-DKG que é muito instável. A reação do peróxido de hidrogênio

com o DHA e o 2,3-DKG durante essa rota degradativa, geralmente não é considerada. Contudo, já foi determinado que a reação do  $H_2O_2$  com DHA a pH 7 também pode leva à formação de L-treonato e oxalato (ISBELL & FRUSH, 1979).

Numerosas plantas têm demonstrado sintetizar oxalato a partir do AsA (FRANCESCHI & NAKATA, 2005) e essas novas descobertas no processo de conversão do AsA para OxA são significativas para se compreender a funcionalidade dessa via metabólica em plantas.

### 3. Capítulo 1

## QUANTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA VASSOURA-DE-BRUXA.

### Resumo

Ácido oxálico (OxA) é um produto natural de do metabolismo de plantas, animais e outros organismos, podendo ocorrer na forma de ácido livre ou como sais de oxalato solúveis e insolúveis. Muitas vias metabólicas possíveis para síntese de OxA foram descritas para plantas. Uma delas envolve a participação do ácido ascórbico (AsA) e vem estimulando o interesse dos pesquisadores no metabolismo do AsA e sua relação com a formação do OxA nas plantas. Nesse trabalho os níveis de OxA e AsA livres foram acompanhados em variedades de *Theobroma cacao* contrastantes para resistência a *Moniliophthora perniciosa*, durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, com a finalidade de verificar se as alterações observadas seriam condizentes com as observações feitas anteriormente para o padrão de formação de oxalato de cálcio na variedade suscetível e com experimentos que comprovaram o envolvimento do AsA na formação do OxA em idioblastos de tecidos vegetais. Também foram verificadas as alterações nos níveis de peróxido de hidrogênio durante os primeiros estágios da doença, traçando um perfil cromatográfico para cada variedade. Foi observado que ambas apresentavam um padrão semelhante nas variações de OxA livre, porém só na suscetível ocorreu uma variação significativa nos níveis de AsA. A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observada nas duas variedades foi bastante semelhante, a não ser pela grande quantidade observada ao redor das células do sistema vascular na variedade resistente. Os dados indicam que o aumento dos cristais de oxalato de cálcio observados anteriormente na variedade suscetível pode ser decorrente do

aumento dos níveis de AsA, porém a formação de OxA livre nas plantas de *T. cacao* não se deve exclusivamente ao AsA uma vez que foram evidentes as variações dos níveis de OxA na variedade resistente sem alteração nos de AsA.

**Palavras-chave:** Oxalato de cálcio, ácido ascórbico, ácido oxálico, peróxido de hidrogênio.

### 3.1. INTRODUÇÃO

Ácido oxálico (OxA) tem sido detectado em quantidades variáveis em quase todos os tecidos de muitas plantas, podendo ocorrer como ácido livre, porém é mais comum encontrá-lo na forma de sais solúveis como os de sódio e potássio ou insolúveis como o de cálcio, formando cristais de oxalato de cálcio (CaOxA) (FRANCESCHI & NAKATA, 2005). A ocorrência e a distribuição de oxalatos podem variar entre os órgãos da mesma planta, sendo mais comum encontrá-los nas folhas do que nas raízes. Variações na quantidade de oxalato também podem ser observadas em decorrência de diversos fatores como idade da planta, estação do ano, clima, tipo de solo e infecção por patógenos (SRIVASTAVA & KRISHNAN, 1959; CEITA et al., 2007).

Muitas espécies de plantas, incluindo plantas cultiváveis, são capazes de acumular grandes quantidades de oxalato e muitos estudos têm demonstrado que ele pode desempenhar várias funções na planta, incluindo regulação da quantidade de cálcio livre, balanço iônico (ex.: K e Na), defesa, sustentação tecidual e detoxificação de metais pesados (LIBERT & FRANCESCHI, 1987; LIU et al., 2002; EVANS et al., 2003; FRANCESCHI & NAKATA, 2005). A oxalato oxidase (EC: 1. 2. 3. 4), enzima envolvida no processo de degradação do ácido oxálico e conversão para CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode estar envolvida no processo de degradação do ácido oxálico proveniente da dissolução dos cristais de CaOxA nos vacúolos dos idioblastos. A proteína está presente em condições de crescimento com limitação da quantidade de cálcio, porém não foi detectada em condições de maior disponibilidade (VOLK et al., 2002). A superexpressão da oxalato oxidase de trigo em girassol disparou a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e respostas de defesa por parte da planta (DAVLETOVA et al., 2005). Por outro lado, durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, em tecidos

de *T. cacao* suscetível infectado por *M. pernicioso*, ocorreu um aumento do número de CaOxA em paralelo ao desenvolvimento do fungo seguido por uma elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio, possivelmente resultante da degradação desses cristais e que, contrariamente, favorece o desenvolvimento do patógeno (CEITA et al., 2007). Isso significa que *M. pernicioso* suporta altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Deste modo, a participação do CaOxA na biologia das plantas superiores, principalmente no que diz respeito a sua função nas interações entre plantas e patógenos ainda permanece controversa.

Existem inúmeras vias metabólicas possíveis para síntese do OxA descritas para plantas e desde que o ácido ascórbico (AsA) foi proposto como uma das vias para formação do oxalato vem estimulado o interesse dos pesquisadores no metabolismo do AsA e sua relação com a formação do OxA nas plantas. A abundância de ácido ascórbico e sua distribuição nos tecidos verdes e não verdes da planta faz dele um dos melhores substratos para formação de oxalato (SMIRNOFF & WHEELER, 2000; SMIRNOFF, 2001; FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

Foi comprovado que o AsA possui uma função importante como precursor do OxA e do CaOxA em idioblastos de *Pistia stratiotes* e que o glicolato é um substrato muito pobre para síntese de OxA e formação de CaOxA (KEATES et al., 2000). O trabalho corroborou as descobertas de Wheeler, Jones e Smirnoff (1998), confirmando que a L-galactose é um intermediário chave na conversão da D-glicose para AsA nas plantas. No mesmo ano Simpson e Ortwerth (2000), apresentaram dados esclarecedores do processo de conversão do AsA para oxalato. Os autores demonstram *in vitro*, que o L-dehidroascorbato (DHA) e o 2,3-L-diketogulonato (2,3-DKG), produtos da oxidação do AsA, são capazes de levar à formação de oxalato em condições oxidativas e sem a participação enzimática no processo. A reação do peróxido de hidrogênio com o DHA e o 2,3-DKG durante essa rota degradativa, geralmente não é considerada. Contudo, já foi determinado que a reação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com DHA a pH 7 também pode levar à formação de L-treonato e oxalato (ISELL & FRUSH, 1979). Essas descobertas no processo de converção do AsA para OxA são significativas para compreendermos a funcionalidade dessa via metabólica em plantas já que numerosas plantas têm demonstrado sintetizar oxalato a partir do AsA (FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

Neste trabalho as variações nas quantidades de AsA e OxA livres foram quantificados por cromatografia isocrática de exclusão iônica em planta de *T. cacao* resistentes (TSH 1188) e suscetíveis (Catongo) ao *M. perniciosa*. As alterações observadas mostram que as variedades respondem de forma diferente ao estresse e que o aumento dos níveis de AsA na variedade suscetível foi condizente com as alterações no número de CaOxA observadas por Ceita et al. (2007) e indicam sua participação na formação dos cristais de oxalato de cálcio em *T. cacao* como proposto por Keates et al. (2000) para plantas superiores de metabolismo C4. Também foram analisadas as alterações nos níveis de peróxido de hidrogênio nos estágios iniciais da infecção, sendo observadas respostas similares nas duas variedades quanto à sua produção nas células da epiderme, porém H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> só foi detectado em células do córtex da variedade resistente. Também foi investigado o papel do nitrogênio (N) na formação do CaOxA em *T. cacao* na tentativa de compreender como o nitrogênio está envolvido em sua síntese.

## **3.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1. Material vegetal**

Cem sementes de *T. cacao* Catongo (susceptíveis ao *M. perniciosa*) e cem plântulas oriundas de estaquia de *T. cacao* TSH 1188 (resistentes) foram cultivadas em tubetes plásticos, contendo solo esterilizado e cultivadas em condições de casa de vegetação no CEPEC/CEPLAC (Centro de Pesquisas da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – Ilhéus, Bahia) por um período de 30 dias. Após esse período as folhas basais de cada plântula foram cortadas para estimular o crescimento uniforme de regiões meristemáticas, obtendo plantas com distribuição homogênea. Após cinco dias as plântulas foram inoculadas artificialmente pipetando 30 µL de uma suspensão de basidiósporos ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) de *M. perniciosa* (cepa isolada de *T. cacao* na CEPLAC) na gema apical de cada plântula (FRIAS et al., 1995). Feitas as inoculações, as plântulas permaneceram por 24 horas em câmara climatizada a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade próxima a 100% para acentuar a germinação do basidiósporo, a penetração no hospedeiro e conseqüentemente o estabelecimento da infecção, retornando em seguida à Casa de Vegetação (SILVA et al., 2000).

Testes de viabilidade dos esporos foram realizados em câmara úmida e incubadora (25°C), 24 horas após inoculação, sendo compatível com a viabilidade obtida antes da inoculação. Gemas apicais de três plantas de cada grupo foram coletadas a 0, 3, 15, 30, 45, 60, 75, dias após inoculação (DPI). Como controle um grupo similar de plantas não infectadas foram coletadas durante o mesmo período. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, estocadas a -80°C, liofilizadas, maceradas até a obtenção de um pó fino e estocadas a -20°C.

### **3.2.2. Análise de ácidos orgânicos por HPLC**

O material vegetal para extração e quantificação dos ácidos orgânicos foi processado com descrito por Keates et al. (2000) com algumas modificações: Cerca de 6 mg do material liofilizado e macerado de cada planta foi suspenso em 1mL do tampão de extração contendo 4 mmol . L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mmol . L<sup>-1</sup> de DTT e 0,01 % de PVPP a uma concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. O material foi agitado por 15 min no vortex e centrifugado a 14.000 rpm por 20 min em T.A. O sobrenadante foi filtrado (0,45 µm) e cerca de 100 µL foi aplicado no HPLC para análise e detecção do AsA e OxA (coluna de exclusão iônica Bio-Rad Aminex HPX-87H, 300 x 7.8 mm, fluxo de 0,7 mL x min<sup>-1</sup>, 25°C, sistema automatizado de cromatografia líquida de alto desempenho ÄKTAbasic™ da GE Health Care). Os dados do HPLC foram integrados e analisados com o software UNICORN™ v. 5.0. AsA foi mensurado a 243 nm ( $R_t = 10$ ) e o OxA a 210 nm ( $R_t = 8$ ) Alíquotas padrão de ácido oxálico e ácido ascórbico a concentrações conhecidas foram usadas para construção da curva padrão para verificar as quantidades ASA e OxA.

### **3.2.3. Detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo método de coloração com DAB**

Plantas de *T. cacao* foram inoculadas como descrito anteriormente. Gemas apicais de 24 plantas das variedades suscetível e resistente foram cortadas e coradas com 3,3'- diaminobenzidene (DAB)-HCl, pH 3.8 (Sigma), como descrito por Thordal-Christensen et al. (1997). As amostras foram imersas em 1 mg x mL<sup>-1</sup> de DAB infiltradas a vácuo por 4 h. Amostras controle foram infiltradas e incubadas com água destilada. As gemas apicais foram fervidas em etanol (96%) por 20 min e foram feitos cortes à mão livre com lâmina de aço, montados em glicerol 50% e

examinadas em microscópio ótico. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi visualizado como uma coloração marrom claro nas células vizinhas ao sistema vascular e células da epiderme.

#### **3.2.4. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas no acúmulo de ácido oxálico livre em uma variedade suscetível de *Theobroma cacao***

Sessenta plantas da variedade suscetível de *T. cacao* (*Catongo*) foram postas para germinar como descrito anteriormente em 3.2.1. Quando todas as plantas apresentavam seis folhas, foram tratadas com duas fontes de nitrogênio diferentes, trocando o elemento nitrogênio do meio nutritivo por só nitrato ou só amônia. As plantas foram adubadas a intervalos de 15 dias. O meio nutritivo preparado para adubação com amônia continha uréia, superfosfato triplo e cloreto de potássio. O de nitrato continha nitrato de potássio e superfosfato triplo. As formulações foram preparadas de forma a apresentarem 5% de N e P e 15 % de K. As amostras foram coletadas nos tempos 0 e 15 dias antes da inoculação com os basidiósporos de *M. pernicioso* e 15, 30 e 60 dias após a inoculação. Para cada tratamento e dia de coleta foram coletadas amostras de três plantas diferentes (réplicas biológicas), uma folha de cada planta, e processadas para análise em HPLC como descrito anteriormente. Foram feitos cortes transversais a mão livre da região apical de todas as plantas coletadas e analisados em microscópio ótico para avaliar as alterações no número de drusas de oxalato de cálcio durante o experimento.

### **3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1. Quantificação de ácido oxálico e ascórbico livres durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa**

Foi observado anteriormente em uma variedade suscetível de *T. cacao* infectada com *M. pernicioso* que durante o desenvolvimento da doença ocorria um aumento do número de cristais de CaOxA, em paralelo ao desenvolvimento do patógeno, e que subsequentemente desapareciam em estágios mais avançados da doença (CEITA et al., 2007). Com o propósito de verificarmos se as alterações nos níveis de OxA e AsA em variedades suscetíveis eram condizentes com as observações anteriormente descritas para *T. cacao*, foram feitas análises por

cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A variedade resistente também foi analisada na tentativa de verificarmos discrepâncias no perfil cromatográfico que pudessem ser relacionadas ao padrão de resistências. A curva-padrão mostrou um  $R^2$  elevado para ambos os ácidos orgânicos (Figura 3.1).

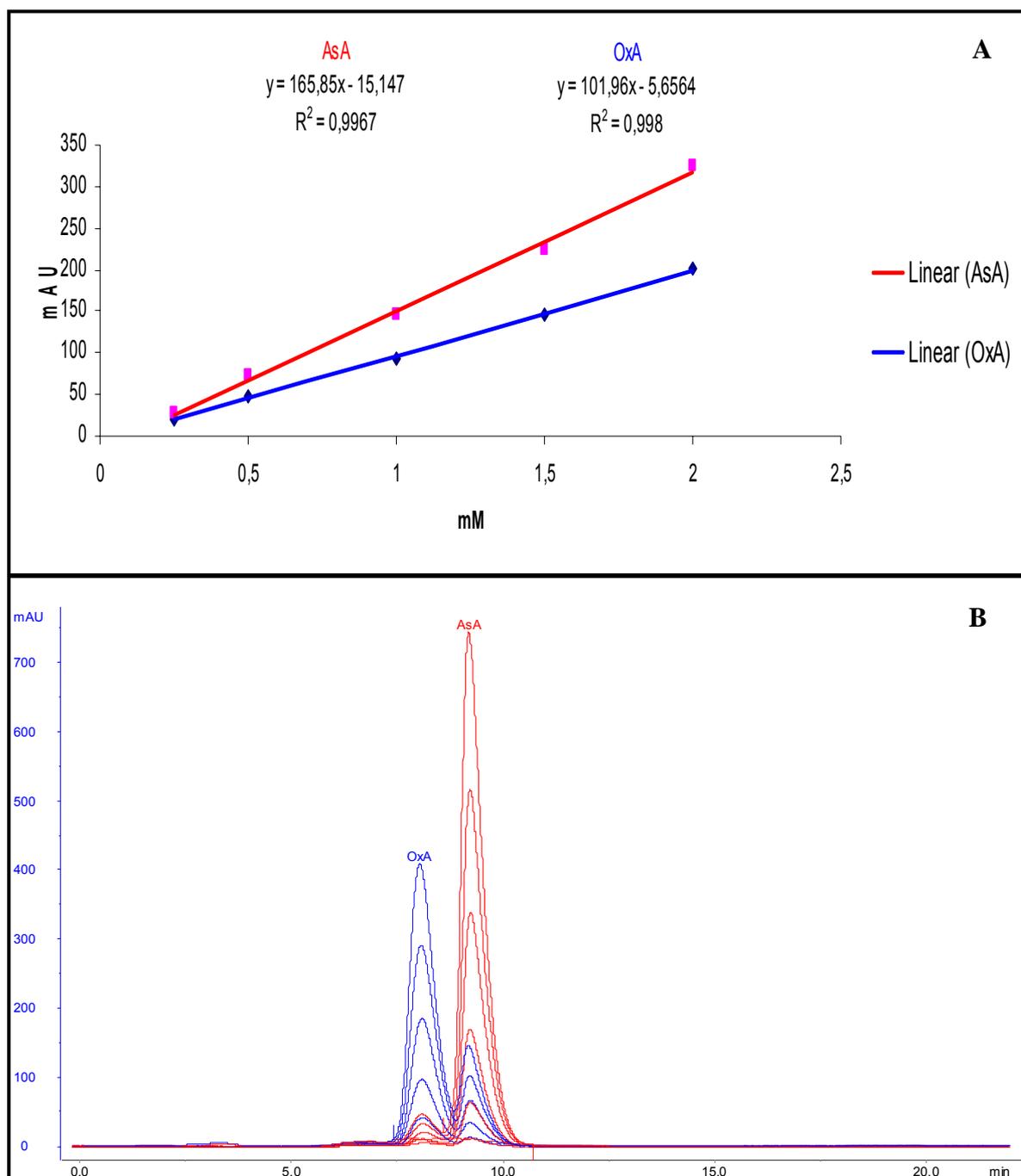


Figura 3.1. Construção da curva padrão. Alíquotas de ácido oxálico e ácido ascórbico a concentrações de 0,25 0,5 1, 1,5 e 2 mmol . L<sup>-1</sup> foram utilizadas para construção da curva padrão, valores das áreas dos picos em mili-unidade de absorvância (A). Sobreposição dos

cromatogramas, mostrando o tempo de retenção das frações de ácido oxálico e ácido ascórbico (B).

### **3.3.1.1. Determinação dos níveis de OxA durante a doença em variedades de *T. cacao***

A análise cromatográfica revelou que as variedades não infectadas de *T. cacao* possuíam níveis basais de OxA bem distintos. TSH 1188 apresentou três vezes mais OxA do que a variedade *Catongo*, isso pode ser decorrente de diferenças na idade dos materiais utilizados. Os níveis de oxalato nas plantas podem variar em decorrências de diversos fatores, como idade, estação do ano, tipo de solo e infecção por patógenos (SRIVASTAVA & KRISHNAN, 1959). E como as amostras de TSH 1188 utilizadas no experimento foram clones produzidos por estaquia, essas variações eram esperadas. No entanto o padrão de resposta à infecção por *M. perniciosa* foi um pouco mais evidente na variedade *Catongo* do que na resistente.

Foi observado um aumento de 81% dos níveis de OxA na variedade suscetível ( $11,23 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de massa seca), quando comparada com o controle ( $6,2 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de massa seca) e 59% na variedade resistente ( $36,27 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de massa seca) também em relação a seu controle ( $22,69 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  de massa seca) 72 horas após a infecção como mostrado na (Figura 3.2). Tem sido sugerido que a síntese de OxA possa ocorrer nas plantas como forma de balancear o excesso de cátions inorgânicos ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ), normalmente presentes nas plantas, ou para detoxificar metais pesados que possam ser danosos ao seu desenvolvimento (FRANCESCHI & NAKATA, 2005).

Seguindo esse raciocínio, em ambos os casos o aumento nos níveis de OxA nos primeiros estágios da infecção pelo patógeno pode ser uma forma de balancear alterações nos níveis de cátions em decorrência de alterações metabólicas. Por outro lado, muitos fungos necrotróficos secretam ácido oxálico durante o processo de infecção para seqüestrar o cálcio da parede celular, tornando as frações de pectina mais disponíveis à ação das hidrolases fúngicas e promovendo uma diminuição do pH, necessária para atividade máxima das enzimas degradativas da parede celular liberadas pelo fungo (DUTTON & EVANS, 1996; MUNIR et al., 2001). Desta forma, o maior aumento dos níveis de OxA na variedade *Catongo* pode contribuir para o desenvolvimento da infecção. Contrariamente a essa afirmação foi

observado na variedade resistente uma maior constância nos níveis de OxA livre durante o primeiro mês de infecção (Figura 3.3). Após esse período as variações observadas nas duas variedades foram muito similares.

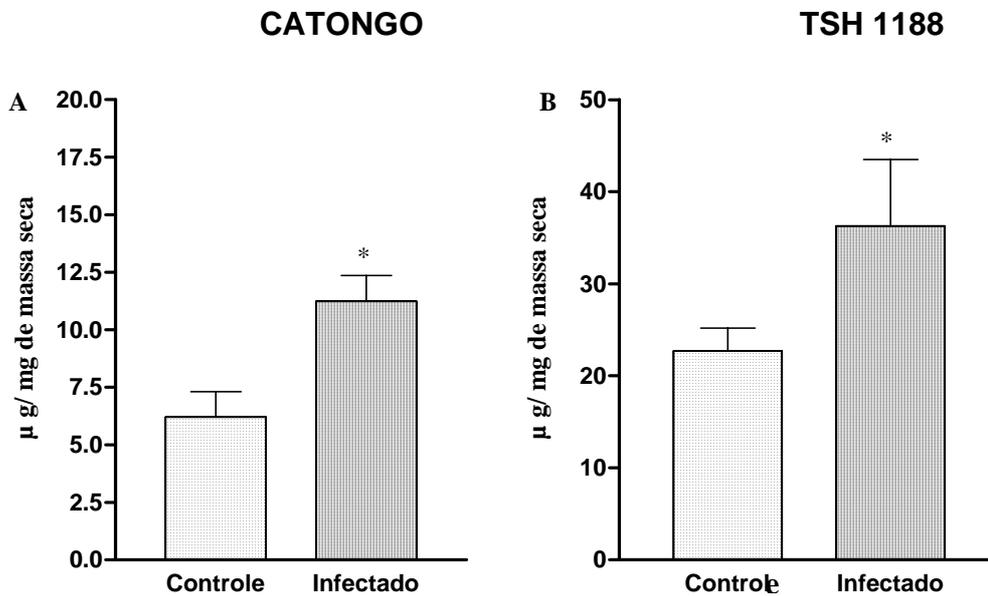


Figura 3. 2. Efeito da indução com *M. perniciosa* na quantidade de OxA livre em variedades suscetíveis (A) e resistente (B) de *T. cacao* 72 h após a inoculação. Médias de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão (\*  $P \leq 0,05$ ).

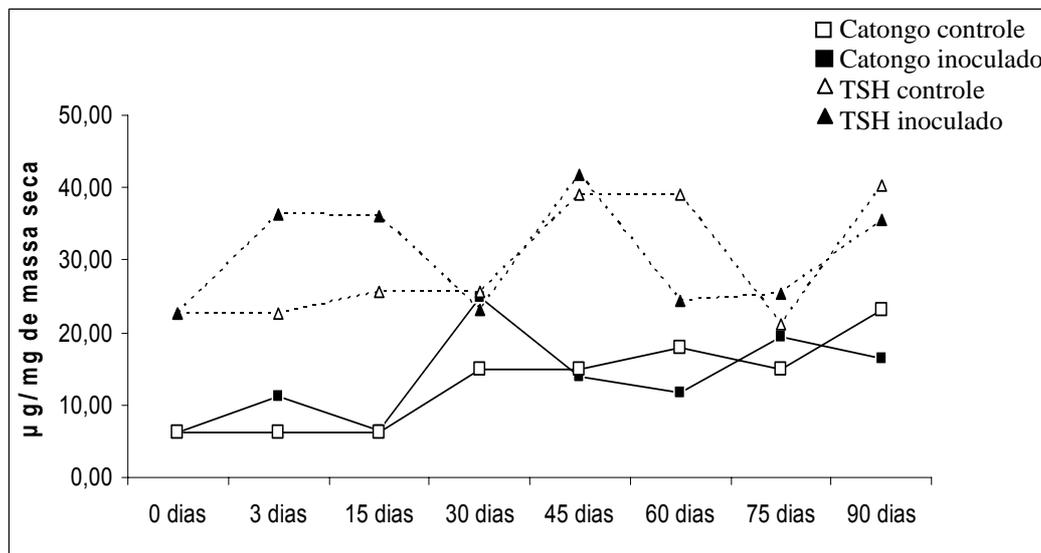


Figura 3.3. Variação dos níveis de ácido oxálico livre durante o desenvolvimento da doença nas variedades resistente e suscetível.

### 3.3.1.2. Determinação dos níveis de AsA durante a doença em variedades de *T. cacao*

A possibilidade do envolvimento do AsA na formação de oxalato vem estimulando o interesse de muitos pesquisadores (WAGNER & LOEWUS, 1973; SMIRNOFF & PALLANCA, 1996; SMIRNOFF, 2000). Observações anteriores feitas em *T. cacao* durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa mostraram um acúmulo de ascorbato na variedade *Catongo* em decorrência da infecção pelo patógeno. Esses achados e a comprovação da participação preferencial do AsA na formação de cristais de oxalato de cálcio em idioblastos de *Pistia stratiotes* (KEATES et al., 2000), serviram de estímulo para se investigar a participação do AsA na formação dos cristais de CaOxA em *T. cacao*, verificando se as alterações nos seus níveis eram condizentes com a formação de cristais de oxalato de cálcio descrito por Ceita et al. (2007).

As análises cromatográficas revelaram um aumento da quantidade de AsA livre muito parecido com o aumento do número de drusas descrito por Ceita et al. (2007) para *T. cacao* durante a infecção por *M. perniciosa* (Figura 3.4). Nos primeiros estágios da infecção o nível de AsA na variedade *Catongo* subiu 60% (11,43  $\mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$  de massa seca) em relação ao controle (7,11  $\mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$  de massa seca), enquanto que na variedade resistente as alterações observadas não foram significativas (Figura 3.5). Assim como o OxA, os níveis basais de AsA na variedade resistente eram 1,6 vezes maior que na variedade suscetível, possivelmente em decorrências das mesmas variáveis.

O ácido ascórbico é considerado uma das principais moléculas anti-oxidantes presente nas plantas e um co-fator de muitas enzimas. Como anti-oxidante AsA atua na detoxificação de espécies ativas de oxigênio (EAO), como radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (WOLUCKA et al., 2005). O AsA possui ainda um papel relevante, atuando na síntese de giberelinas como co-fator da enzima *2-oxoacid dependent dioxygenase* (PRESCOTT & JOHN, 1996). A enzima *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* também utiliza AsA como substrato no último passo da síntese do etileno (MCGARVEY & CHRISTOFFERSEN, 1992; ROCKLIN et al., 1999). Também é requerido pela dioxigenase, responsável pela clivagem oxidativa dos carotenóides

na via metabólica que leva à formação do fito-hormônio ácido abscísico (SEO & KOSHIBA, 2002). Interessantemente foi demonstrado por Barth et al. (2004) alterações na resposta a patógenos em *Arabidopsis* deficientes na síntese de AsA. Os autores verificaram que quando infectadas com *pseudomonas syringae* ou *Peronospora parasítica* os mutantes de *Arabidopsis vtc1* e *vtc2*, ambos deficientes na síntese de AsA, apresentaram uma redução no crescimento bacteriano e fúngico. Também foi observada no mutante *vtc1* a indução de proteínas relacionadas à patogênese, elevados níveis de transcritos associados com senescência (SAG – *senescence-associated genes*) assim como altos níveis de ácido salicílico (AS) quando comparado com a planta selvagem. A resistência apresentada pelos mutantes de *Arabidopsis* foi presumivelmente atribuída aos baixos níveis de AsA que levam a planta a entrar de forma prematura em um estágio de senescência acompanhado de um aumento dos níveis de AS e que culmina na indução de respostas de defesa. Alguns trabalhos apontam à possibilidade das plantas poderem transduzir o sinal patogênico através de rotas metabólicas alternativas independentes do AS como as vias metabólicas do ácido jasmônico (JA) e do etileno (DONG, 1998; PIETERSE & VAN LOON, 1999). O ácido JA que possui um papel importante nos processos de senescência, defesa e desenvolvimento da planta (LIECHTI & FARMER, 2002), está envolvido na regulação da síntese do AsA em plantas. O metil ester do ácido jasmônico (metiljasmonato, MEJA) foi capaz de estimular a síntese *de novo* do ácido ascórbico em suspensões celulares de *Nicotiniana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* (WOLUCKA et al., 2005), esse foi o primeiro relato da regulação hormonal da síntese de AsA em plantas.

Desta forma é possível que em *T. cacao* o AsA seja o responsável pelo aumento da quantidade de drusas observadas durante o desenvolvimento da doença na variedade *Catongo* o que condiciona a formação e o aumento do número de drusas de CaOxÀ à disponibilidade e ao aumento dos níveis de AsA na planta. No entanto, tudo indica que o AsA não é a única fonte para formação de OxÀ em *T. cacao*, uma vez que foi observado um aumento dos níveis de OxÀ na variedade resistente sem que houvesse alterações nos níveis de AsA durante todo o processo de infecção.

Finalmente, é possível que a variedade resistente seja deficiente na síntese *de novo* de AsA o que pode lhe conferir um fenótipo semelhante ao observado nos mutantes *vtc1* e *vtc2* de *Arabidopsis*. No entanto os dados aqui apresentados são insuficientes para sustentar essa afirmação, sendo necessárias investigações futuras a esse respeito.

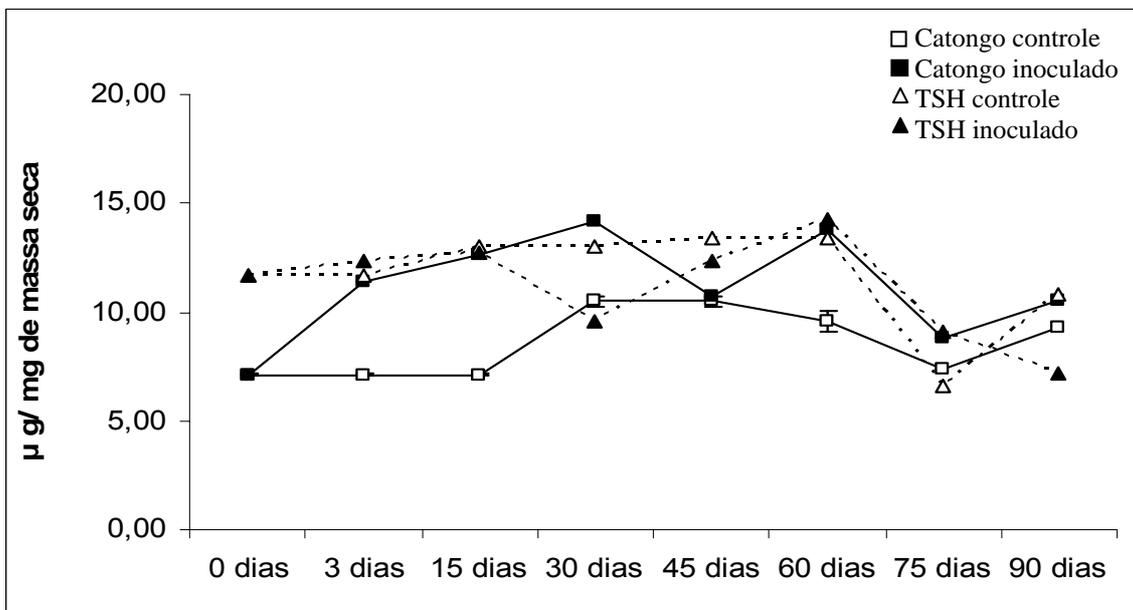


Figura 3.4. Variação dos níveis de ácido ascórbico livre durante o desenvolvimento da doença nas variedades resistente e suscetível.

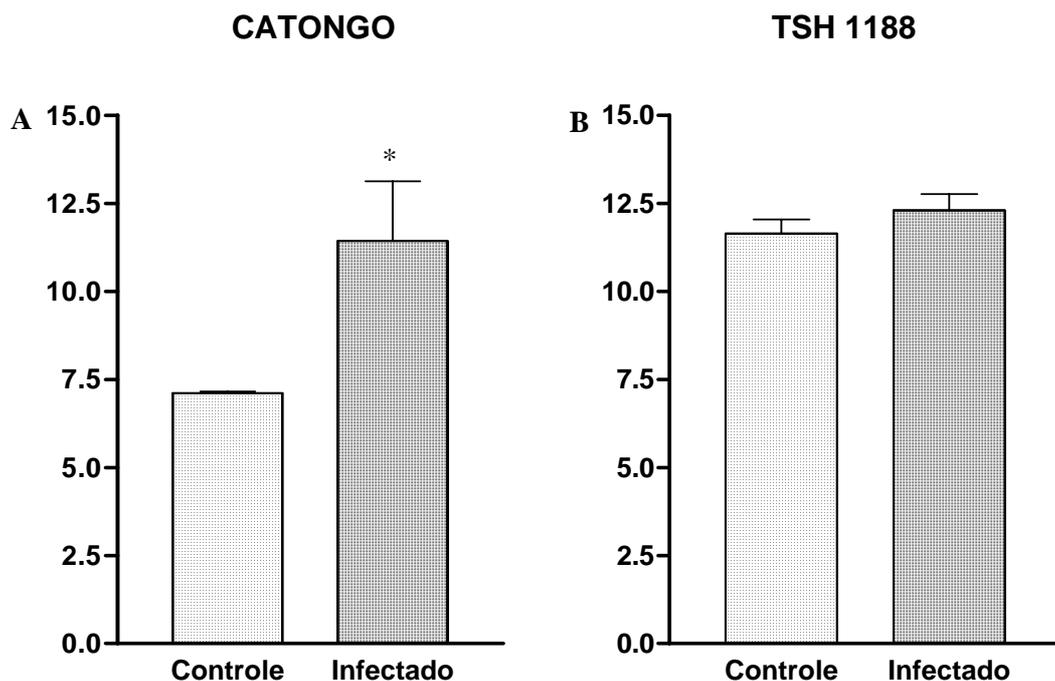


Figura 3.6. Efeito da inoculação com *M. pernicioso* na quantidade de AsA livre em variedades suscetíveis (A) e resistente (B) de *T. cacao* 72 h após a inoculação. Médias de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão (\*  $P \leq 0,05$ ).

### **3.3.2. Avaliação do perfil cromatográfico para ácidos orgânicos nas variedades suscetível e resistente de *T. cacao* durante a infecção por *M. pernicioso***

A quantificação do ácido ascórbico e oxálico durante o processo de infecção da variedade resistente e suscetível permitiu investigar alterações no perfil cromatográfico de diversos ácidos orgânicos nas duas variedades de cacau decorrentes do processo de infecção ao longo do desenvolvimento da doença. Além disso, foi possível determinar as variações nas quantidades de AsA e OxA, também foi possível verificar alterações no perfil cromatográfico, que refletem variações quantitativas, de outras substâncias não identificadas e que por responderem ao processo de infecção variando sua quantidade na célula podem ter um papel importante no processo de infecção e ou resistência.

Durante as primeiras 72 do processo de infecção, foi possível visualizar em TSH 1188 alterações muito significativas nos níveis de um composto com tempo de retenção de 6 min, essa substância foi observada com níveis basais em ambas as variedades, no entanto o padrão de resposta da variedade resistente, com relação ao aumento dessa substância, foi muito significativo quando comparado à variedade suscetível (Figura 3.6). Uma resposta similar à observada na variedade resistente só foi evidente no material suscetível 15 dias após a infecção (Figura 3.7). Algumas tentativas de isolar esse composto foram realizadas sem sucesso, principalmente pela dificuldade de separação da substância desejada do  $H_2SO_4$ , presente na fase móvel, que impossibilitou sua separação de forma íntegra.

As plantas possuem uma variedade de estratégias de defesa contra o ataque por patógenos. As descobertas de novos mecanismos de defesa são cruciais para o desenvolvimento de variedades mais resistentes que podem ser geradas por melhoramento tradicional ou pela biotecnologia moderna (ROZHON et al., 2005) . Nesse sentido é preciso investigar esse padrão de resposta apresentado por TSH 1188 e verificar a provável participação dessa substância no bloqueio do desenvolvimento do fungo, sendo necessário seu isolamento e purificação. Esse

pico está sendo atualmente identificado por espectrometria de massas nos laboratórios da Mars Symbiosciences, Washington DC, USA.

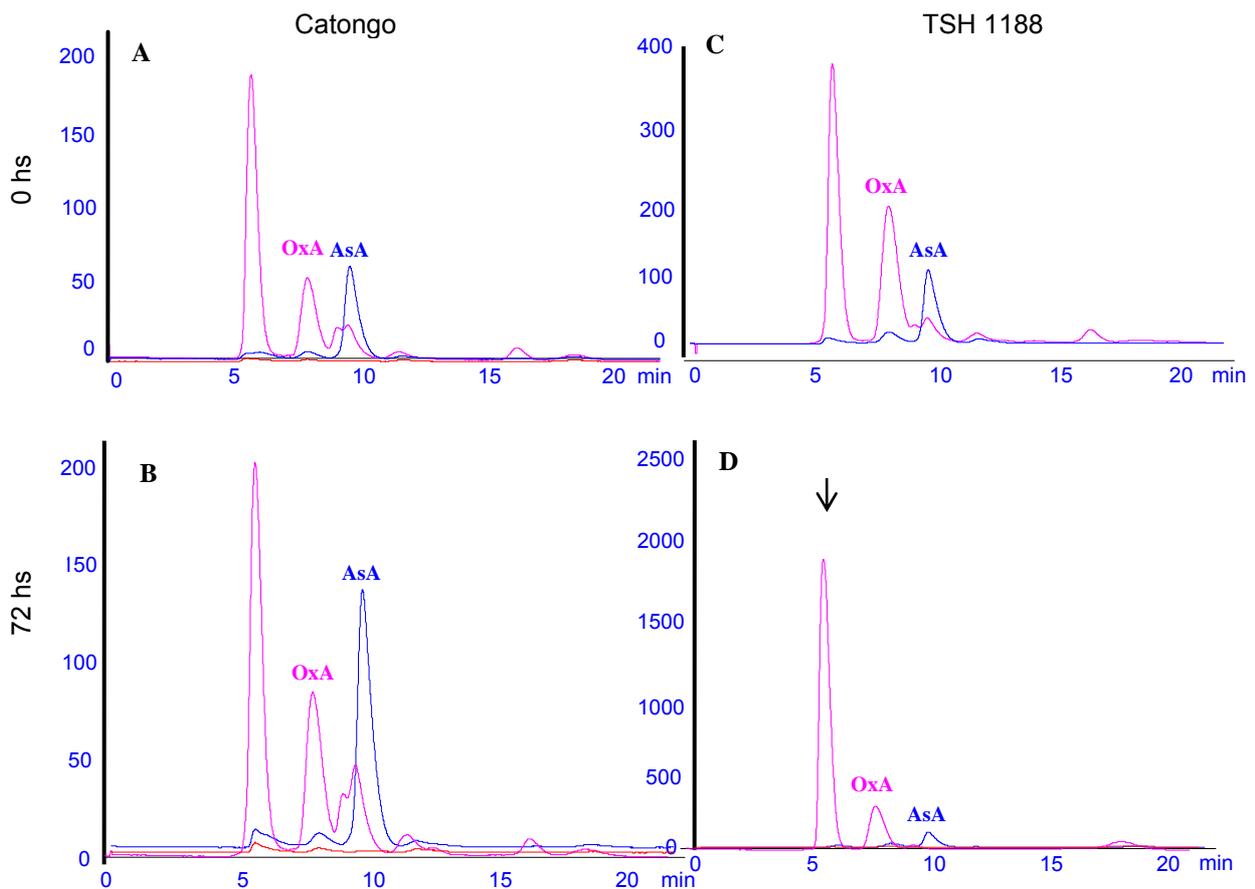


Figura 3.6. Cromatograma mostrando as variações dos níveis de OxA e AsA e de um composto desconhecido (seta) durante as primeiras 72 horas após a infecção na variedade resistente. O padrão de resposta apresentado por TSH 1188 foi muito diferente ao observado na variedade suscetível, em todas as três replicas biológicas da variedade resistente foi observado um aumento dos níveis de um composto desconhecido o que não ocorreu no material suscetível. Variedade suscetível tempo zero antes da inoculação (A), e 72 horas após inoculação (B); variedade resistente no tempo zero, antes da inoculação (C) e 72 horas após a inoculação (D). Os valores do eixo X estão em miliunidade de absorbância arbitrária (mAU).

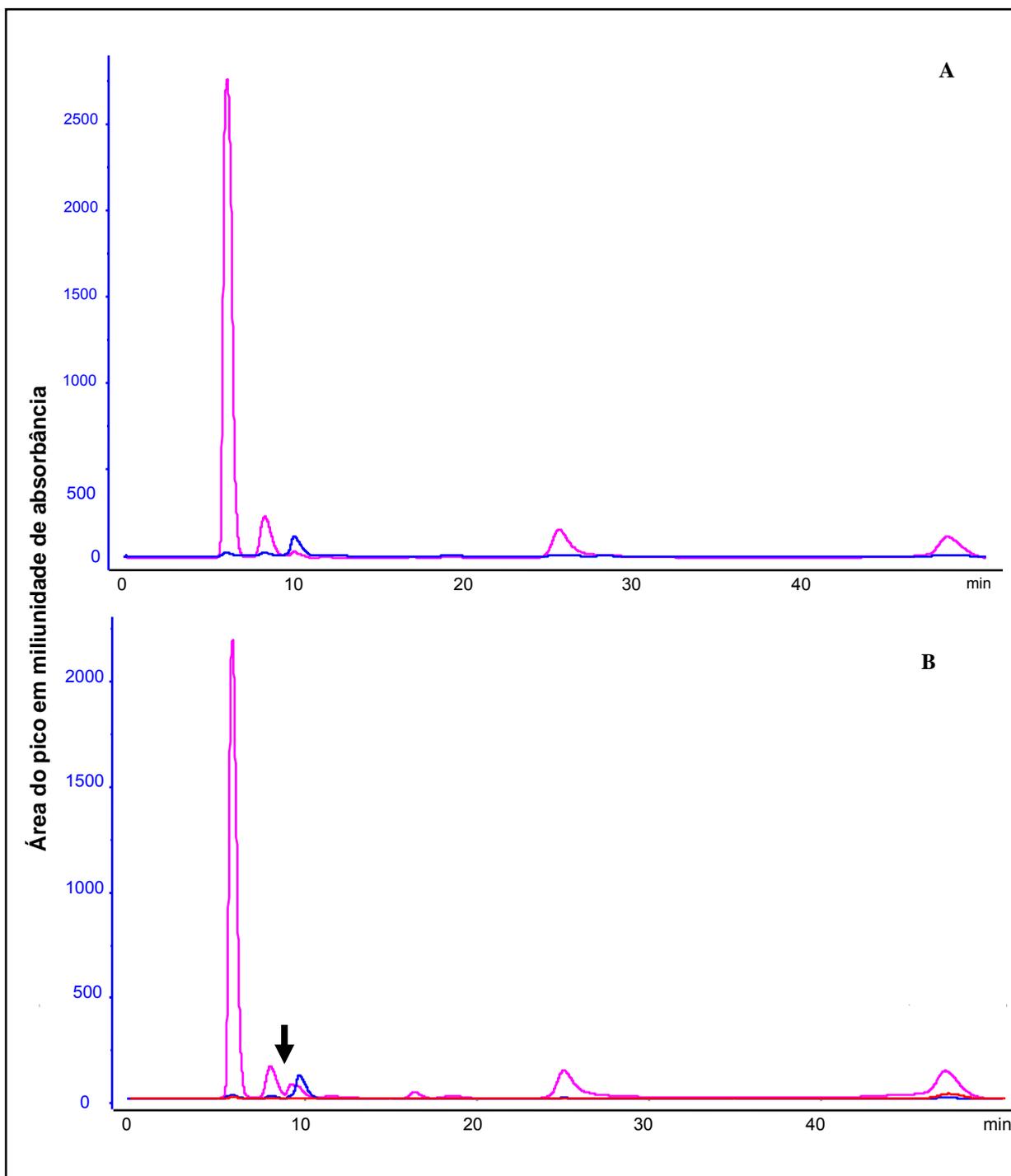


Figura 3.7. Perfil cromatográfico da variedade resistente (A) e suscetível (B) 15 dias após a infecção por *M. pernicioso*. Nesse período é evidente a indução do composto desconhecido com tempo de retenção de 6 minutos em ambas as variedades e o aparecimento de novos compostos na variedade suscetível (seta).

### 3.3.3. Produção de peróxido de hidrogênio nos primeiros estágios da doença

O desenvolvimento de uma metodologia para detecção *in vivo* de peróxido de hidrogênio tornou possível o acompanhamento temporal e espacial de sua produção durante condições de estresse (THORDALCHRISTENSEN et al., 1997). A coloração por DAB (3,3'-diaminobenzidina) é baseada na sua reação com  $H_2O_2$  na presença de peroxidases formando um composto marrom-avermelhado no local da reação. Utilizando essa metodologia foi possível detectar a produção de peróxido de hidrogênio nos primeiros estágios do desenvolvimento da vassoura-de-bruxa na variedade suscetível e o padrão de resposta apresentado pela variedade resistente. Peróxido de hidrogênio é um importantíssimo mensageiro celular envolvido na ativação de inúmeros genes em plantas, principalmente aqueles relacionados ao estresse oxidativo e genes que codificam para fatores de transcrição (SCANDALIOS, 2005).

Após as primeiras 24 horas do período de infecção a marcação com DAB pôde ser observada nas células da epiderme das duas variedades de *T. cacao*, porém só na variedade resistente foi possível detectar a produção de  $H_2O_2$  na periferia das células do sistema vascular (Figura 3.8f). Isso possivelmente, pode estar relacionado ao processo de reconhecimento do patógeno e transdução do sinal mediado pela produção de  $H_2O_2$ .

Foi observado que na variedade suscetível a *M. pernicioso* ocorre um acúmulo de  $H_2O_2$  por uma vasta extensão das células da epiderme, sendo mais evidente 48 horas após a infecção (Figura 3.8g). Se esse padrão na resposta de acúmulo de  $H_2O_2$  influencia ou não na suscetibilidade, deve ser mais estudado. Ceita et al. (2007) mostraram um grande acúmulo de peróxido aos 45 DAI, o que nesse caso certamente favoreceu à infecção pelo patógeno e desencadeou o processo de morte celular programada.

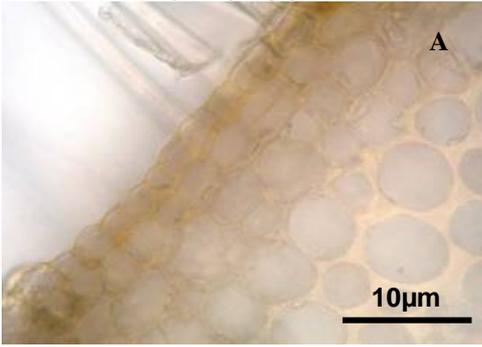
Em interações patogênicas incompatíveis de plantas dicotiledôneas uma explosão oxidativa com duas fases distintas é geralmente observada, sendo que a primeira também ocorre em interações compatíveis enquanto que a segunda e mais prolongada fase depende da presença de um par de genes R- e Avr (BAKER & ORLANDI, 1995). Adicionalmente foi proposto por Hüchelhoven et al. (2000) a participação de três fases distintas para produção  $H_2O_2$  nas interações incompatíveis. A primeira fase de produção de peróxido de hidrogênio ocorre 6

horas após a infecção quando o tubo germinativo primário do fungo patogênico se liga à superfície celular do hospedeiro que reage com o espessamento da parede celular bem abaixo dessa estrutura. A segunda fase é associada com a tentativa do fungo de penetrar no hospedeiro. Caso ocorra a penetração é observada uma produção de  $H_2O_2$  na parede celular das células adjacentes ao sítio de infecção 18 horas após a infecção. Não ocorrendo penetração é observado um acúmulo de  $H_2O_2$  em vesículas citoplasmáticas abaixo do apressório do tubo germinativo 14 horas após a tentativa de infecção. Na terceira fase, exclusiva das interações incompatíveis, é observado um acúmulo de  $H_2O_2$  em toda a célula atacada da epiderme ou do mesófilo subjacente 24 horas após a infecção.

A produção de  $H_2O_2$ , disparada por estresses bióticos e abióticos, tem sido atribuída à atividade apoplástica de peroxidase da NAD(P)H oxidase. No entanto a inibição de sua atividade com DPI (diphenylene iodonium) possibilitou a redução do número de células da epiderme que mostravam uma produção maciça de  $H_2O_2$ , mas foi incapaz de inibir a produção de peróxido nas zonas de ligação entre as células atacadas e as células do mesófilo inferior (VERA-ESTRELLA et al., 1992). Ceita et al. (2007) propuseram a participação da enzima oxalato oxidase na formação de  $H_2O_2$  na interação patogênica entre *T. cacao* e *M. pernicioso* em estágios mais avançados da doença.

Esses autores levantam a possibilidade do envolvimento da enzima na formação de uma explosão maciça de  $H_2O_2$  por todo o ramo afetado, proveniente da dissolução das drusas de oxalato de cálcio e que contraditoriamente auxiliam o processo de infecção. É possível que a oxalato oxidase também esteja envolvida na formação de peróxido de hidrogênio nos estágios iniciais da doença na variedade *Catongo*, devido a grande quantidade de drusas presentes logo abaixo das células da epiderme (Figura 3.8i), assim como é evidente sua participação na formação de  $H_2O_2$  detectado 24 h após a infecção por todo meristema da variedade resistente, visto que as drusas eram quase inexistentes, contrariamente ao observado na variedade suscetível no mesmo período (Figura 3.8j). A expressão do gene da oxalato oxidase foi detectada por RT-PCR semi-quantitativo em ambas as variedades (CEITA et al., 2007).

CATONGO



TSH 1188

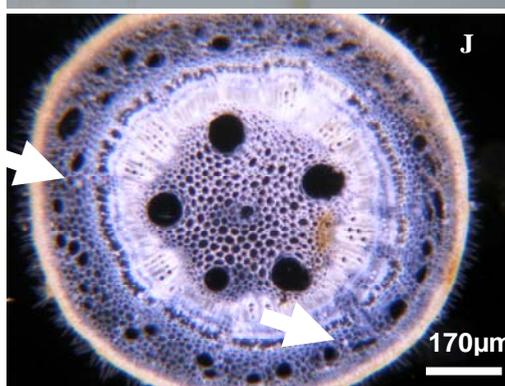
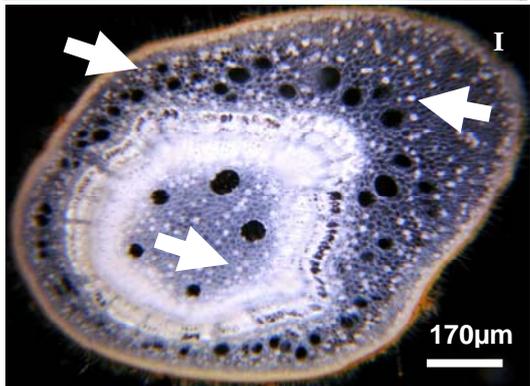
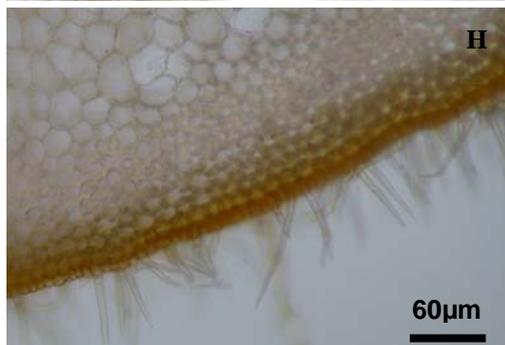
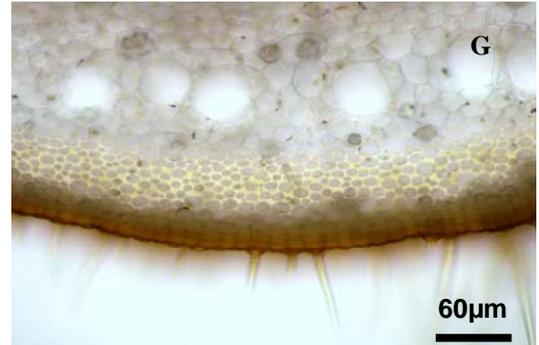
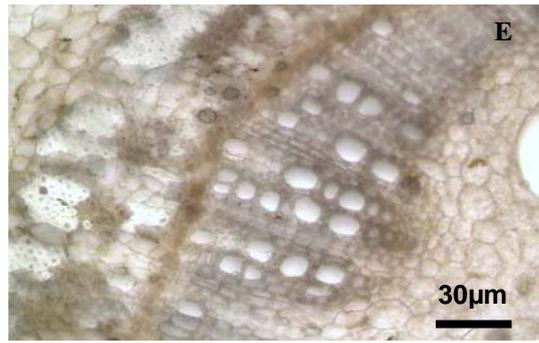
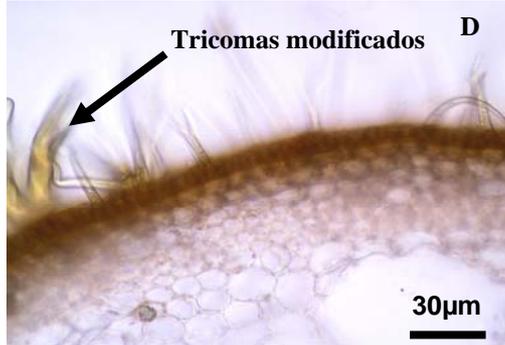


Figura 3.8. Detecção do peróxido de hidrogênio em células da epiderme de *T. cacao* durante os primeiros estágios do processo de infecção por *M. perniciosa* em TSH 1188 e . As duas variedades foram inoculadas com basidiósporos do fungo e seus meristemas foram coletados para análise da marcação com DAB a períodos de 24, 48 e 72 horas após a infecção (hpi). A coloração por DAB é visualizada como um polímero de cor marrom-avermelhado em associação com a parede das células da epiderme ou na periferia das células do sistema vascular. Todos os cortes foram feitos à mão livre e analisados em microscópio ótico. **(A)** Células da epiderme da variedade suscetível, 24 após a inoculação e infiltradas com H<sub>2</sub>O (controle), mostrando uma coloração verde claro, possivelmente em decorrência de resquícios de clorofila 24 hpi. **(B)** Células da epiderme da variedade resistente 24 hpi mostrando o mesmo padrão. **(C)** Células da variedade suscetível 24 hpi infiltradas com DAB, sendo possível visualizar uma coloração marrom-avermelhada associada à parede celular de todas as células da epiderme. **(D)** variedade resistente 24 hpi e infiltrada com DAB, mostrando o mesmo padrão de coloração. **(E)** Região do sistema vascular da variedade suscetível 24 hpi não apresentando traços de reação com DAB. **(F)** Região do sistema vascular da variedade resistente 24 hpi, sendo possível visualizar uma reação intensa com DAB na vizinhança das células do sistema vascular. **(G)** Detecção intensa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 48 hpi nas células da variedade suscetível. **(H)** Variedade resistente 48 hpi, apresentando uma coloração menos intensa. **(I)** Foto-micrografia, mostrando a distribuição das drusas de oxalato de cálcio por toda a extensão de um corte transversal da gema apical na variedade suscetível 24 hpi. **(J)** Foto-micrografia da variedade resistente, onde não se observa a presença de drusas durante a produção maciça de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 24 hpi, possivelmente em decorrência da dissolução dos cristais e da atividade da oxalato oxidase. As setas indicam a presença de drusas de oxalato de cálcio.

No entanto, ainda não foi definido como se dá a expressão dessa enzima nos tecidos das duas variedades, desta forma estudos de localização *in situ* da atividade da oxalato oxidase nos ajudarão à compreender o padrão de resposta apresentado pelas duas variedades e qual o verdadeiro papel dessa enzima na variedade resistente e na suscetível. A participação dos cristais de oxalato de cálcio e o envolvimento da oxalato oxidase na produção de  $H_2O_2$ , durante os primeiros estágios da doença, na variedade suscetível e na resposta apresentada pela variedade resistente pode ser corroborado pela detecção de peróxido de hidrogênio em regiões adjacentes a cristais de oxalato de cálcio como mostrado na figura 3.9.

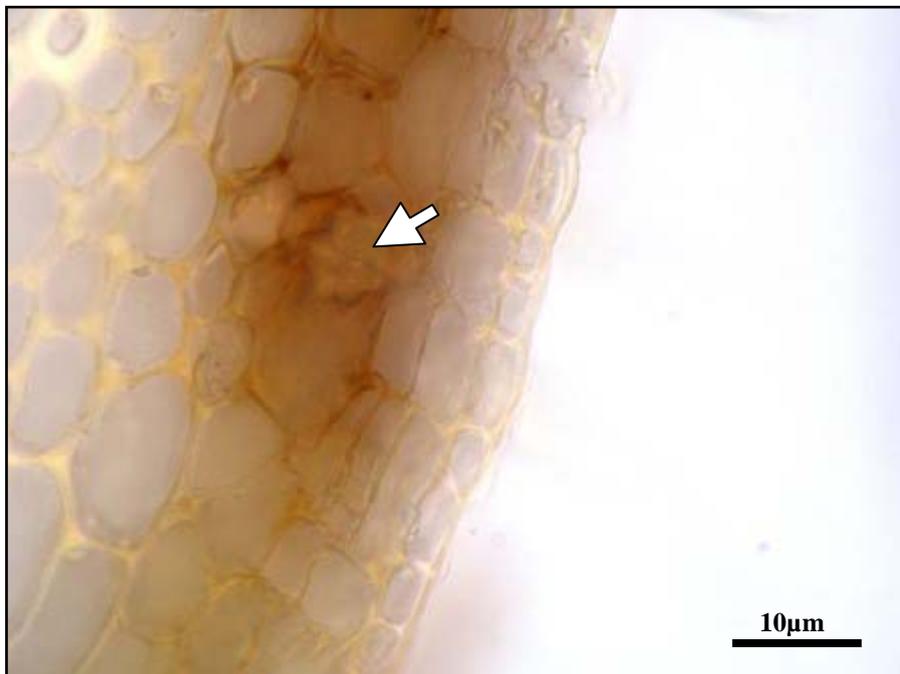


Figura 3.9. Detecção de peróxido de hidrogênio em células adjacentes a um cristal de oxalato de cálcio nas primeiras 24 h após inoculação com *M. pernicioso* na variedade resistente de *Theobroma cacao*. Seta mostrando a presença do cristal, sendo possível visualizar uma reação intensa com DAB (marrom-avermelhado) nas células adjacentes.

### **3.3.4. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas no acúmulo de ácido oxálico livre em variedades suscetíveis de *Theobroma cacao***

Não foram constatadas mudanças nos níveis de AsA e OxA ao longo do experimento (Figura 3.10). Isso pode ter sido consequência de um efeito de dose, com baixa disponibilidade de íons que pudessem gerar uma resposta efetiva ou efeito da lixiviação do adubo em decorrência da irrigação descontrolada. Como descrito anteriormente, é possível que o AsA esteja envolvido na formação dos cristais de oxalato de cálcio em *T. cacao* e partindo desse pressuposto esperávamos que houvesse um aumento nos níveis de OxA paralelamente aos de AsA. No entanto, a não ser pela variação observada 15 dias após o início do tratamento para os níveis de AsA (88%) os níveis de OxA mantiveram-se constantes por todo período do tratamento. Desta forma, recomenda-se repetir o experimento com controle da lâmina de água.

A possibilidade da inibição da oxidase do oxalato através da adubação com nitrato pode ajudar no entendimento do processo de infecção desencadeado pelo fungo, desta forma é preciso dar continuidade a esses estudos; novos experimentos estão sendo traçados e futuramente podem trazer dados esclarecedores.

Algumas plantas mostram variações nas quantidades de oxalato em decorrência da nutrição com nitrogênio (LIBERT & FRANCESCHI, 1987). A quantidade de oxalato em plantas de arroz foi alterada drasticamente em decorrência da nutrição com fontes de nitrogênio distintas. A adubação com nitrato estimulou significativamente o acúmulo de oxalato nas folhas de arroz, por outro lado a adubação com amônia teve um efeito contrário (LIU et al., 2002). Já foi sugerido que a síntese de oxalato ocorra para balancear o excesso de cátions inorgânico (como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$  e  $Ca^{++}$ ), por outro lado anions como  $NO_3^-$  e  $Cl^-$  foram capazes de inibir a atividade da oxidase do ácido oxálico em plantas de *Beta vulgaris* (ÇALISKA, 2000). Outro trabalho também relata que o nitrato atua como um sinal direto que induz o acúmulo de ácidos orgânicos (SCHEIBLE et al., 1997).

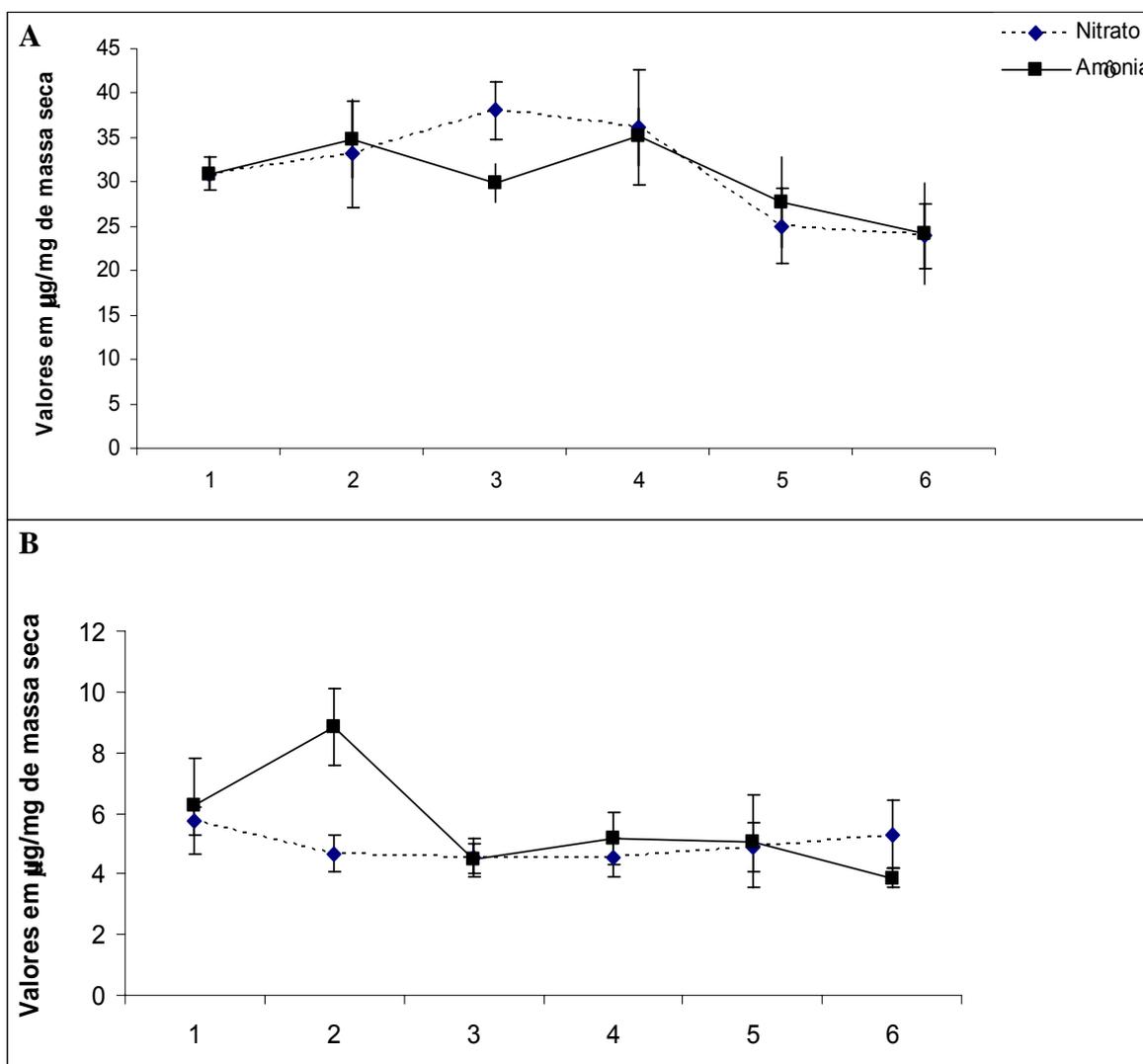


Figura 3.10. Variações nas quantidades de ácido oxálico (A) e ascórbico (B) durante o tratamento com duas fontes de nitrogênio diferentes. Plântulas com quatro folhas foram adubadas com meio conteúdo só nitrato ou só amônia como descrito na metodologia. As amostras foram coletadas de três plântulas diferentes a intervalos regulares de tempo ao longo do tratamento, sendo feitas três coletas antes da inoculação com *M. perniciosa* e três posteriores a inoculação. Os valores mostrados são as médias das três repetições biológicas  $\pm$  o desvio padrão.

### 3.5. CONCLUSÕES

- As alterações apresentadas em ambas as variedades para os níveis de OxA livre pode ser uma tentativa da planta de balancear o fluxo de cálcio e outros íons decorrentes do processo de infecção ou pode ser um mecanismo de defesa comum às variedades, uma vez que o ácido oxálico pode ser tóxico a alguns microrganismos.
- Os altos níveis de OxA na variedade suscetível pode estar contribuindo para o desenvolvimento do patógeno, favorecendo a degradação da parede celular por enzimas do patógeno e desencadeando a morte celular programada.
- Existe uma grande possibilidade de que a formação e o aumento da quantidade de drusas de oxalato de cálcio na variedade suscetível estejam correlacionados à elevação dos níveis de AsA. Por outro lado, AsA pode não ser a via preferencial de formação de OxA livre em *T. cacao*, uma vez que foram observadas variações na quantidade de OxA na variedade resistente sem que houvesse um aumento significativo dos níveis de AsA.
- É possível que AsA possa ter um papel importante na resistência e suscetibilidade ao patógeno.
- O padrão de resposta para síntese de ácidos orgânicos apresentado pela variedade resistente forneceu evidências do possível envolvimento de um composto desconhecido na resistência ao ataque do patógeno uma vez que foi altamente induzido nas primeiras 72 h após a infecção.
- É evidente a participação dos cristais de oxalato de cálcio na formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, possivelmente em decorrência da atividade da oxalato oxidase.
- Foi evidente a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células adjacentes ao sistema vascular da variedade resistente e que possivelmente pode ter um papel importante na ativação de genes de defesa e lignificação da parede celular.

### 3.6 .REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active Oxygen in Plant Pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 299-321. 1995.

BARTH, C.; MOEDER, W.; KLESSIG, D. F.; CONKLIN, P. L. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. **Plant Physiol**, v. 134, n. 4, Apr, p. 1784-92. 2004.

ÇALISKA, M. The metabolism of oxalic acid. **Turk Journal of Zoology**. n. 24, p. 103-106. 2000.

CEITA, G. O.; MACÊDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA, A. DA S.; MICHELI, F. ; MARIANO, A. C. ; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. A. G. ; CASCARDO, J. C .M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Crinipellis pernicioso*. **Plant Science**. 2007. (no prelo).

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H. J.; ZHONG, S. Q.; OLIVER, D. J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 17, n. 1, Jan, p. 268-281. 2005.

DONG, X. N. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, n. 4, Aug, p. 316-323. 1998.

DUTTON, M. V.; EVANS, C. S. Oxalate production by fungi: Its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 9, Sep, p. 881-895. 1996.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, v. 52, n. 4, Aug, p. 476-485. 2003.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu Rev Plant Biol**, v. 56, p. 41-71. 2005.

FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. An Inoculation Method for Evaluating Resistance of Cacao to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v. 79, n. 8, Aug, p. 787-791. 1995.

HUCKELHOVEN, R.; FODOR, J.; TRUJILLO, M.; KOGEL, K. H. Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. hordei are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. **Planta**, v. 212, n. 1, Dec, p. 16-24. 2000.

ISELL, H. S.; FRUSH, H. L. Reactions of Carbohydrates with Hydroperoxides .11. Oxidation of L-Ascorbic-Acid by Hydrogen-Peroxide - Preparation of L-Threonic Acid. **Carbohydrate Research**, v. 72, n. Jul, p. 301-304. 1979.

KEATES, S. E.; TARLYN, N. M.; LOEWUS, F. A.; FRANCESCHI, V. R. L-Ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 4, Feb, p. 433-40. 2000.

LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in Crop Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 6, Nov-Dec, p. 926-938. 1987.

LIECHTI, R.; FARMER, E. E. The jasmonate pathway. **Science**, v. 296, n. 5573, May 31, p. 1649-1650. 2002.

LIU, H.; YANG, X.; ZHOU, L.; XU, H. [Study on effects of scutellarin on scavenging reactive oxygen]. **Zhong Yao Cai**, v. 25, n. 7, Jul, p. 491-3. 2002.

MCGARVEY, D. J.; CHRISTOFFERSEN, R. E. Characterization and Kinetic-Parameters of Ethylene-Forming Enzyme from Avocado Fruit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, Mar 25, p. 5964-5967. 1992.

MUNIR, E.; YOON, J. J.; TOKIMATSU, T.; HATTORI, T.; SHIMADA, M. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, Sep 25, p. 11126-11130. 2001.

PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 2, Feb, p. 52-58. 1999.

PRESCOTT, A. G.; JOHN, P. Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 245-271. 1996.

ROCKLIN, A. M.; TIERNEY, D. L.; KOFMAN, V.; BRUNHUBER, N. M. W.; HOFFMAN, B. M.; CHRISTOFFERSEN, R. E.; REICH, N. O.; LIPSCOMB, J. D.; QUE, L. Role of the nonheme Fe(II) center in the biosynthesis of the plant hormone ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, Jul 6, p. 7905-7909. 1999.

ROZHON, W.; PETUTSCHNIG, E.; WRZACZEK, M.; JONAK, C. Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 7, Aug, p. 1620-1627. 2005.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, Jul, p. 995-1014. 2005.

SCHEIBLE, W. R.; GONZALEZFONTES, A.; LAUERER, M.; MULLERROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **Plant Cell**, v. 9, n. 5, May, p. 783-798. 1997.

SEO, M.; KOSHIBA, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 1, Jan, p. 41-48. 2002.

SILVA, S. D. M. V.; LUZ, E. D. M. N.; GRAMACHO, K. P.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; BEZERRA, J. L. Standardization of the belt system method to assess cacao genotypes to witches' broom resistance. In: **Proceedings 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, 2000.

SRIVASTAVA, S. K.; KRISHNAN, P. S. Oxalate content of plant tissues. **Journal of Science industri. Res.**, n. 18C, p. 146-148. 1959.

SMIRNOFF, N. L-ascorbic acid biosynthesis. **Vitam Horm**, v. 61, p. 241-66. 2001.

SMIRNOFF, N.; PALLANCA, J. E. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 24, n. 2, May, p. 472-8. 1996.

SMIRNOFF, N.; WHEELER, G. L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 4, p. 291-314. 2000.

THORDALCHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z. G.; WEI, Y. D.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**, v. 11, n. 6, Jun, p. 1187-1194. 1997.

VERA-ESTRELLA, R.; BLUMWALD, E.; HIGGINS, V. J. Effect of Specific Elicitors of Cladosporium-Fulvum on Tomato Suspension Cells - Evidence for the Involvement of Active Oxygen Species. **Plant Physiology**, v. 99, n. 3, Jul, p. 1208-1215. 1992.

VOLK, G. M.; LYNCH-HOLM, V. J.; KOSTMAN, T. A.; GOSS, L. J.; FRANCESCHI, V. R. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in Pistia stratiotes leaves. **Plant Biology**, v. 4, n. 1, Jan, p. 34-45. 2002.

WAGNER, G.; LOEWUS, F. Biosynthesis of L-Ascorbic-Acid and (+)-Tartaric Acid in Pelargonium-Crispum. **Plant Physiology**, v. 51, p. 48-48. 1973.

WHEELER, G. L.; JONES, M. A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v. 393, n. 6683, May 28, p. 365-9. 1998.

WOLUCKA, B. A.; GOOSSENS, A.; INZE, D. Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. **J Exp Bot**, v. 56, n. 419, Sep, p. 2527-38. 2005.

## 4. Capítulo 2

### ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Theobroma cacao* POR MACROARRANJO DE DNA

#### Resumo

Em monoculturas, o surgimento de doenças pode levar ao desenvolvimento de grandes epidemias, ocasionando perdas agronômicas consideráveis e reduzindo a qualidade do produto final. No Brasil uma de suas principais regiões produtoras de cacau, localizada no sul do estado da Bahia, vem sofrendo desde 1989 com os agravos de umas das principais doenças agronômicas da região, a vassoura-de-bruxa (VB). A doença desencadeada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, um fitopatógeno hemibiotrófico endêmico da região amazônica, foi responsável pelo declínio da produção de amêndoas de cacau no país. Na tentativa de verificar variações no padrão de expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo, foi confeccionado um macroarranjo de DNA em membrana de náilon contendo 96 seqüências selecionadas da biblioteca de interação entre *M. perniciosa* e *T. cacao*. A membrana foi hibridizada com cDNA marcado de uma amostra de tecido infectado e outro marcado de uma amostra de tecido sadio. Foi possível identificar 12 seqüências como mais diferencialmente expressas, algumas delas envolvidas no reparo de DNA sob condições de estresse e outras no processo de cloro-respiração (respiração dos cloroplastos) que favorece a formação de  $O_2^-$  e a formação de peróxido de hidrogênio. Os dados aqui apresentados são importantes na medida em que fornecem novos alvos para estudos mais detalhados.

**Palavras-chave:** *Moniliophthora perniciosa*; expressão diferencial

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O fungo *Moniliophthora (=Crinipellis) perniciosa* (Stahel) Aime e Phillips-Mora é o agente causador da vassoura-de-bruxa, uma das mais devastadoras doenças agrônômicas que afetam as culturas de *Theobroma cacao* na América Latina e nas ilhas Caribenhas. *T. cacao* (L.) é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical, originada da América Central e da Amazônia, e suas amêndoas são a matéria-prima para produção de chocolate (PURDY & SCHMIDT, 1996). Os basidiósporos de *M. perniciosa* possuem a habilidade de infectar tecido meristemático apical de *T. cacao* e são considerados os únicos propágulos infectivos do patógeno (EVANS, 1980).

Durante o desenvolvimento da doença o fungo apresenta dois estágios bem distintos: um biotrófico e outro necrotrófico / saprotrófico. No estágio biotrófico o fungo na forma de micélio monocariótico, e crescendo intercelularmente, causa hipertrofia e hiperplasia dos tecidos, perda da dominância apical e proliferação de gemas axilares, as quais resultam na formação de ramos anormais chamados de vassoura-verde. No estágio saprotrófico o fungo se desenvolve intracelularmente com micélio na forma dicariótica, possuindo hifas ligadas por grampos de conexão, e nesse período é capaz de induzir a morte dos tecidos infectados, pela liberação de uma proteína indutora de necrose, levando à formação da vassoura-seca (GARCIA et al., 2007). Nos estágios iniciais da doença a densidade fúngica nos tecidos infectados da planta é muito baixa, mostrando um aumento significativo só após a morte dos tecidos (PENMAN et al., 2000). O ciclo de vida do patógeno é completado após períodos alternados de chuva e seca com a formação dos basidiocarpos e liberação dos esporos (ROCHA & WHEELER, 1985).

Sob o ataque de patógenos as plantas desenvolvem uma variedade de mecanismos de defesa como a expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), produção de fitoalexinas, reforço da parede celular e a produção rápida de espécies ativas de oxigênio num processo designado como explosão oxidativa (DANGL & JONES, 2001). Numerosos estudos têm demonstrado que as células possuem maneiras de perceber esse estresse oxidativo e induzir respostas específicas, mas os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram esclarecidos (SCANDALIOS, 2005). Foi observado em *T. cacao*

que durante o desenvolvimento da doença ocorre uma grande produção de peróxido de hidrogênio nos tecidos infectados da vassoura-verde, possivelmente uma tentativa da planta de combater o patógeno, mas que contrariamente acaba favorecendo o desenvolvimento da doença (CEITA et al., 2007). O peróxido de hidrogênio pode atuar como molécula sinalizadora, regulando o desenvolvimento da planta, a adaptação a estresses e a morte celular programada (GECHEV et al., 2004). O reconhecimento e defesa do hospedeiro contra o ataque de patógenos e a habilidade dos patógenos de prevenir ou sobrepor as defesas do hospedeiro implicam em uma complexa e dinâmica rede de sinalização entre os organismos, sendo necessário a ativação ou repressão de genes envolvidos nesses processos (ROS et al., 2004).

Nesse contexto a investigação de mudanças no padrão de expressão de genes durante o processo de interação patógeno hospedeiro pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias que busquem o controle de pragas agrônômicas. Neste trabalho, foram desenvolvidos e utilizados arranjos de cDNA em membranas de náilon contendo 96 seqüências, escolhidas de uma biblioteca de interação entre *T. cacao* e *M. pernicioso*. As seqüências foram utilizadas para investigar as mudanças no padrão de expressão gênica na fase em que o estresse oxidativo é supostamente mais evidente, entre 40 e 60 dias após a infecção, e representam uma tentativa de contribuir para o entendimento da regulação gênica durante a interação suscetível.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Construção do macroarranjo de DNA

Produtos de PCR de 96 seqüências de clones das bibliotecas da interação *M. pernicioso* – *T. cacao* resistente (RT) e suscetível (SP), desenvolvidas na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), foram imobilizados em uma membrana de náilon de 12 x 15 cm<sup>2</sup>. Todas as seqüências foram transferidas para a membrana em quadruplicata, na tentativa de melhorar a reprodutibilidade, com o auxílio de um replicador manual. Como controles internos, foram imobilizadas na membrana seqüências que codificam para síntese de proteínas constitutivas e que teoricamente não apresentam variações nos seus níveis de expressão. Os clones isolados das bibliotecas da interação foram crescidos em meio LB para extração do DNA plasmidial (Figura 4.1) que posteriormente serviu de molde para amplificação e isolamento dos insertos (Figura 4.2). As seqüências amplificadas foram desnaturadas com uma solução de NaOH a concentração final de 0,2 mol . L<sup>-1</sup> a 37°C por 15 minutos, transferidas para uma membrana de náilon e imobilizadas via UV *crosslinking* a 120 mJ cm<sup>-2</sup>, usando UV crosslinker modelo XL-1000 UV Crosslinker (Spectronics Corporation).

Para evitar variações provenientes da quantidade de DNA transferido para a macroarranjo, todas as hibridizações foram realizadas com a mesma membrana.

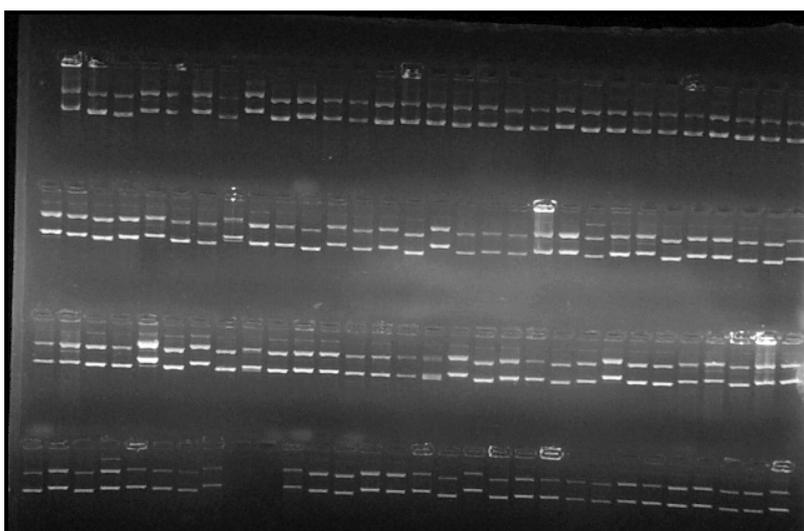


Figura 4.1. Microprep dos 96 clones da biblioteca. A figura mostra o padrão de migração para os vetores extraídos dos clones da biblioteca.

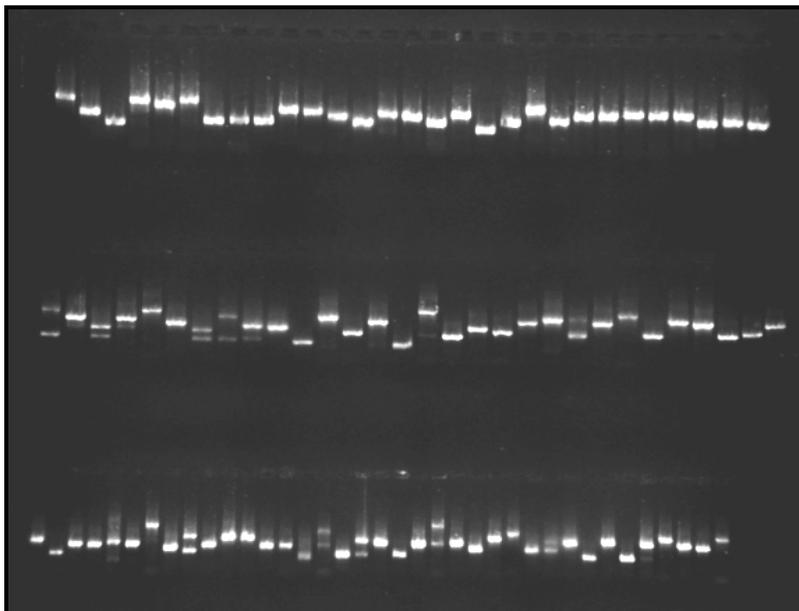


Figura 4.2. PCR das 96 seqüências inseridas nos vetores. As reações foram realizadas até 38 ciclos com a finalidade de se obter bandas saturadas contendo grandes quantidades de DNA.

#### 4.2.2. Material vegetal

Sementes de *Theobroma cacao* cv (suscetível ao *M. pernicioso*) foram postas para germinar em tubetes plásticos, contendo solo esterilizado e cultivadas em condições de casa de Vegetação CEPEC/CEPLAC (Centro de Pesquisas da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – Ilhéus Bahia) por um período de 30 dias (Figura 4.3a). Após esse período as folhas basais de cada plântula foram cortadas para estimular o crescimento uniforme de regiões meristemáticas, obtendo plantas com distribuição homogênea. Após cinco dias as plântulas foram inoculadas artificialmente pipetando 30µL de uma suspensão de basidiósporos ( $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) de *C. pernicioso* (cepa isolada de *T. cacao* na CEPLAC) na gema apical de cada plântula (FRIAS et al., 1995). Feitas as inoculações as plântulas permaneceram por 24 horas em câmara climatizada a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade próxima a 100% para acentuar a germinação do basidiósporo, a penetração no hospedeiro e conseqüentemente o estabelecimento da infecção, retornando em seguida à Casa de Vegetação (SILVA et al., 2000). Teste de viabilidade de esporos foi feito em câmara úmida e incubadora ( $25^\circ\text{C}$ ), 24 horas após inoculação, sendo compatível com a viabilidade obtida antes da inoculação. Gemas apicais de três plantas foram coletadas quando apresentavam sintomas característicos de vassoura-verde,

quando presumivelmente o estresse oxidativo é maior (Figura 4.3b). Como controle um grupo similar de plantas não infectadas foram coletadas durante o mesmo período. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração do mRNA.



Figura 4.3. Plântulas de *Theobroma cacao*: Visão geral da casa de vegetação CEPLAC-Ilhéus-BA (A). Vassoura verde 45 dias após inoculação, apresentado hipertrofia decorrente do desequilíbrio hormonal causado pelo fungo.

#### 4.2.3. Extração de RNA

As extrações de RNA total de *T. cacao* foram realizadas com descrito por Gesteira et al. (2003) com algumas modificações: As amostras estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram maceradas em nitrogênio líquido até se obter um pó fino. Cerca de 10 mg desse pó foi colocado em um tubo de 2 mL previamente resfriado em nitrogênio líquido e acrescentado 2 mL do tampão de extração ( $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de ácido bórico,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de EDTA, 0,5% de SDS e  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\beta$  Mercaptoetanol, adicionado só na hora do uso), agitados até sua total homegenização em vortex e centrifugados por 10 min ( $10.000 \text{ rpm}$ ) a temperatura ambiente. Um mililitro do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionado 1mL de fenol:clorórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogenizados por 5 min e centrifugados por 10 min ( $14.000 \text{ rpm}$ ) a temperatura ambiente. Foi recuperado 0,9 mL do sobrenadante, adicionado 0,9 mL de clorórmio:álcool isoamílico (24:1), agitado por 10 min a temperatura ambiente e centrifugado por 10 min ( $14.000 \text{ rpm}$ ).

Do sobrenadante foram recuperados 600  $\mu$ L e adicionados 60  $\mu$ L NaAc 3M pH 4.3 e 0,4 volumes de butanol terciário, agitados levemente e deixados no gelo por 30 min. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 min (14.000 rpm) a temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,6 volumes de butanol terciário. As amostras foram deixadas no gelo por mais 30 min, centrifugadas por 15 min (14.000 rpm) a temperatura ambiente até a formação de um precipitado translúcido, lavadas com álcool 70%, secas até a retirada de todo o álcool e resuspensas com água DEPC. A integridade do RNA foi atestada em gel de agarose 1% (Figura 4.4).

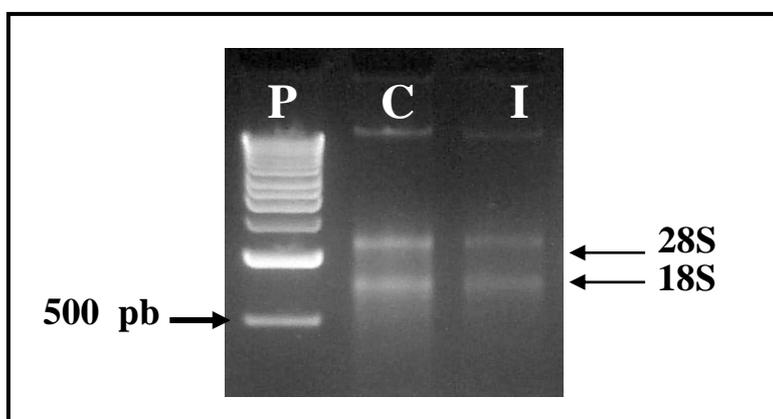


Figura 4.4. Extração de RNA total de *Theobroma cacao*. Gel de agarose mostrando a qualidade do RNA extraído das amostras controle (C) e infectada (I).

#### 4.2.4. Purificação do RNA

O RNA total extraído foi purificado para isolamento do mRNA como descrito no kit da Qiagen (RNeasy<sup>®</sup>): O volume do RNA extraído foi ajustado para 100  $\mu$ L com água livre de RNase e foram adicionados 350  $\mu$ L do tampão RLT, fornecido pelo kit. Ao homogeneizado foram adicionados 250  $\mu$ L de etanol absoluto e misturados com auxílio de uma pipeta. 700  $\mu$ L do homogeneizado foi aplicado em uma mini-colluna em um tubo de 2 mL e centrifugado por 15 s a  $>8000 \times g$  ( $> 10000$  rpm), descartando o líquido residual. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL, adicionado 500  $\mu$ L do tampão RPE e centrifugado por 15 s a  $> 8000 \times g$ , descartando o líquido residual. 500  $\mu$ L de etanol a 80% foi adicionado à coluna e centrifugado por 2 min a  $> 8000 \times g$  para secar a membrana de sílica gel. A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL e centrifugada a velocidade máxima por 5 min pra retirada de todo o álcool da membrana. Para eluir o mRNA da

coluna ela foi transferida para um tubo de 1.5 mL fornecido pelo kit e foram adicionados 14  $\mu$ L de água livre de RNase no centro da membrana e centrifugados por 1 min em máxima rotação.

#### 4.2.5. Amplificação linear do mRNA (transcrição *in vitro*)

A extração de RNA de *T. cacao* é muito trabalhosa e devido à grande quantidade de mucilagem (FIGUEIRA,1994) presente na planta e aos passos de purificação necessários para sua remoção, a quantidade de RNA extraído foi muito pequena. O que dificulta a utilização de procedimentos onde são necessárias grandes quantidades de mRNA. Para sanar esse problema lançamos mão da utilização da metodologia de transcrição *in vitro* como descrita por Wang (2005).

##### 4.2.5.1. Síntese da primeira fita

Em um tubo de PCR foram misturados 0,01- 0,05 $\mu$ g do mRNA em 9  $\mu$ L de DEPC H<sub>2</sub>O com 1  $\mu$ L do primer oligo dT (15)T7 (5`AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T<sub>(15)</sub>3`), 1  $\mu$ L de RNase Out e aquecidos por 3 minutos a 70 °C, resfriados à temperatura ambiente e adicionados os seguintes reagentes:

4  $\mu$ L do tampão 5x para síntese da primeira fita.

1  $\mu$ L (0,1 – 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ L) de primer TS (5`AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3`)

2  $\mu$ L de DTT 0,1 M

2  $\mu$ L de dNTP mix (10 mmol . L<sup>-1</sup> de cada).

1  $\mu$ L Superscript II ®

50 °C por 90 min no termociclador.

##### 4.2.5.2. Síntese da segunda fita

Adicionou-se 106  $\mu$ L de DEPC H<sub>2</sub>O ao tubo de reação do cDNA.

15  $\mu$ L do tampão da Advantage PCR

3  $\mu$ L de dNTP mix (10 mmol . L<sup>-1</sup> de cada).

1  $\mu$ L de RNase H

3  $\mu$ L de *mix Advantage* cDNA polimerase ®.

Incubou-se por:

37 °C 5 min (Digestão do mRNA).

94 °C 2 min (Desnaturação).

65 °C 1 min (Anelamento dos primers).

75 °C 30 min (Extensão).

Reação de parada com 7,5 µL de NaOH 1 M contendo 2 mmol . L<sup>-1</sup> de EDTA, incubando por 10 min a 65°C para inativar as enzimas. (a reação pode ser estocada a -20°C neste passo).

#### 4.2.5.3. Purificação do cDNA fita dupla

Ao tubo de reação de síntese do cDNA dupla fita foram adicionados:

1µL de acrilamida linear (ajudar a precipitação do cDNA dupla fita).

150 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), misturando-se com a pipeta.

A solução foi transferida para um tubo de Phase lock gel e centrifugada por 14.000 rpm por 5 min.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 70 µL de acetato de amônia 7,5 M e em seguida 1mL de etanol 100%.

Centrifugou-se por 20 min a 14.000 rpm.

Lavou-se o *pellet* com 800 µL de etanol 100% centrifugado em velocidade máxima por 8 min.

Secou-se o pellet ao ar livre e solubilizou-se o cDNA em 30 µL de DEPC H<sub>2</sub>O.

#### 4.2.5.4. Transcrição in vitro utilizando o kit da Promega (Ribo MAX ®)

10 µL do tampão de 5x de reação.

2,5 µL de cada dNTP (10 mmol . L<sup>-1</sup> de cada)

24,5 µL do cDNA fita dupla purificado.

5 µL do mix da enzima (T7)

0,5 µL de RNase Out

Misturados gentilmente com a pipeta e incubados a 37°C por 2 a 4 horas e proceder com a purificação.

#### 4.2.5.5. Purificação do aRNA

Adicionou-se 500µL de Trizol ®, misturando com auxílio da pipeta.

Adicionou-se 100µL de clorofórmio, misturados por inversão e deixados por 2-3 min em temperatura ambiente.

Centrifugou-se a 10.000g por 15 min a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 250µL de isopropanol.

Deixando-se no gelo por 5 min e centrifugando-se a 10.000g por 15 min.

O pellet foi lavado com 80 µL de etanol 70%, deixado secar e solubilizado em 20µL de DEPC H<sub>2</sub>O.

Nesse passo foi realizada a quantificação do aRNA no espectrofotômetro.

#### 4.2.5.6. Segunda etapa de amplificação

240 ng de mRNA foi diluído em 9 µL de DEPC H<sub>2</sub>O

Adicionou-se 1µL de primer (dN6)

Aqueceu-se por 3 min a 70°C

Esfriou-se em temperatura ambiente

Adicionou-se 4 µL do tampão 5x para síntese da primeira fita.

1 µL de primer oligi dT-T7 (0,5 – 1ug/µL).

2 µL de DTT 0,1mol x L<sup>-1</sup>

1 µL de Rnase Out 2 µL de dNTP (10 mmol . L<sup>-1</sup> de cada).

1 µL de Superscript II ®.

Incubou-se por 90 min a 42°C (o cDNA pode ser guardado a -20°C).

#### 4.2.6. Marcação da sonda e hibridização

O cDNA da segunda etapa de amplificação da transcrição *in vitro* foi marcado e usado com sonda no processo de hibridização. A marcação da sonda foi realizada como descrito no kit da GE healthcare (Alkaphos Direct Labelling™) baseado no sistema de quimiluminescência do dioxetano, envolvendo a marcação direta de sondas de DNA ou RNA com uma fosfatase alcalina termoestável. A desnaturação da sonda a um estado de fita simples e a adição da solução de ligação cruzada promove a ligação covalente da fosfatase com a sonda de ácido nucléico. A adição do reagente de detecção CPD-Star™ utiliza a atividade catalítica da enzima ligada à sonda pra promover a decomposição do substrato estável de dioxetano, promovendo uma liberação rápida e prolongada de luz.

##### 4.2.6.1. Preparação da sonda marcada

- Diluiu-se 20 µL do cross-linker com 80 µL de água fornecida pelo kit para se obter uma concentração de trabalho (essa solução não deve ser estocada).

- Diluiu-se o cDNA a uma concentração de 10ng/μL em 10μL de água fornecida pelo kit.
- Desnaturou-se 10 μL do cDNA diluído a 95°C no termociclador por 5 minutos, imediatamente resfriou-se no gelo por 5 minutos, centrifugando brevemente em uma microcentrífuga.
- Adicionou-se 10 μL do reagente de reação e misturou-se com auxílio de uma pipeta.
- Adicionou-se 2 μL do reagente de marcação misturando getilmente.
- Adicionou-se 10 μL da solução de trabalho do cross-linker e centrifugou-se brevemente em uma microcentrífuga, incubando em seguida a reação por 30 minutos a 37°C.
- A sonda pode ser usada imediatamente ou deixada no gelo por 2 horas. Por longos períodos, ela pode ser estocada em 50% de glicerol a -20°C, não sendo necessário nenhum tratamento posterior antes da hibridização.

#### 4.2.6.2. Hibridização

Treze mililitros do tampão de hibridização, o necessário para uma membrana de 100 cm<sup>2</sup>, contendo NaCl a uma concentração de 0.5 M e reagente de bloqueio a uma concentração final de 4% (w/v) foram aquecidos a 60°C a membrana foi pré-hibridizada nessa solução por 15 minutos no forno de hibridização sob agitação constante. Transcorrido esse tempo a sonda foi adicionada e deixou-se hibridizando por 16 horas. Após a hibridização foram feitas lavagens para retirar o excesso de sonda não ligada. 100 mL do tampão primário de lavagem contendo 2M de uréia, 0,1% (w/v) de SDS, 50 mmol . L<sup>-1</sup> de fosfato de Na pH 7.0, 150 mmol . L<sup>-1</sup> de NaCl, 1 mmol . L<sup>-1</sup> de Mg Cl<sub>2</sub> e reagente de bloqueio a 2% (w/v) foram feitas duas lavagens seguidas de 10 minutos cada uma a 60°C. Mais duas lavagens foram realizadas à temperatura ambiente em um tampão secundário contendo 50 mmol . L<sup>-1</sup> de Tris base, 100 mmol . L<sup>-1</sup> de NaCl e 2 mmol . L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>

#### 4.2.7. Geração do sinal e detecção

Após secar o excesso de tampão secundário foram adicionados 5 mL do reagente de detecção sobre a membrana e deixada descansando por 5 minutos, após esse período o excesso do reagente de detecção foi removido, tocando o

canto da membrana em uma superfície não absorvente, e a membrana foi colocada dentro do cassete de exposição, nesse ponto é necessário evitar o contato do reagente de detecção diretamente com o filme, isso pode ser obtido com o auxílio de um plástico transparente. O filme foi exposto por 1 hora a TA e posteriormente revelado.

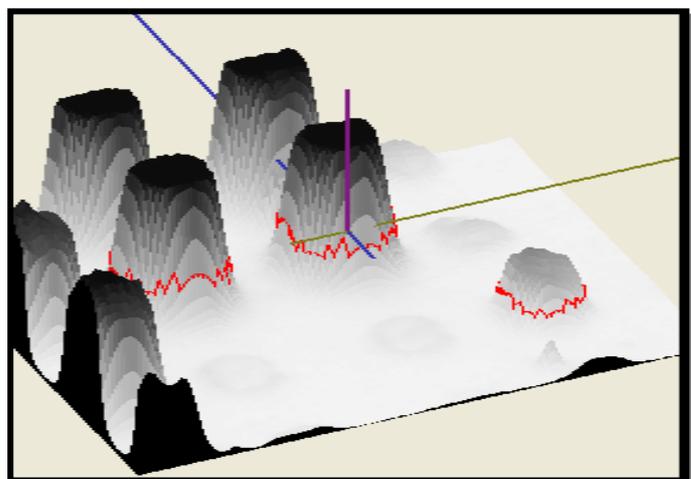
#### 4.2.8. Captura dos dados e normalização

Duas hibridizações independentes foram realizadas com o cDNA marcado para o material controle e o infectado. Após a hibridização e a exposição ao filme de auto-radiografia (Hyperfilme™ ECL) foram realizadas a detecção e a quantificação dos *spots* de cada membrana. O processo de detecção e quantificação só foi possível com o auxílio do *software* ImageMaster 2D platinum (GE Healthcare), um poderoso e eficiente programa para detecção da expressão diferencial de proteínas em gel bidimensional, o software permite uma rápida e confiável comparação de imagens e oferece a possibilidade de detecção automática dos *spots*. Para quantificar um *spots* o programa considera sua área, intensidade e volume. Em nosso experimento consideramos o volume relativo de cada *spot* para quantificar diferenças nos níveis de expressão. O volume é calculado pelo programa levando em conta o volume acima do contorno do *spot* que fica a 75% de sua altura (Figura 4.5), já o volume relativo é um valor normalizado que considera o volume de cada *spot* em um gel contendo  $n$  *spots*.

$$\text{Volume relativo } \%Vol = \frac{Vol}{\sum_{S=1}^n Vols} \times 100$$

Onde  $Vols$  é o volume do *spot*  $S$  em um gel contendo  $n$  *spots*.

Figura 4.5. Representação gráfica de uma região da membrana, mostrando a detecção de três *spots* pelo programa ImageMaster 2D platinum. É possível notar que o software automaticamente detecta e subtrai o background da análise das amostras, desta forma a quantificação do volume é realizada com maior precisão.



Na tentativa de normalizar as possíveis alterações decorrentes do processo de hibridização e captura das imagens foram utilizados três controles internos (alfa tubulina, beta tubulina e proteína S18). A razão dos volumes desses *spots* entre as membranas do mesmo grupo (controle ou infectado) nos permitiu obter um coeficiente para normalização intra-classe. A razão dos volumes desses mesmos genes, após a normalização intra-específica, com os valores normalizados nas membranas de diferentes grupos (controle e infectado) possibilitou a obtenção de um coeficiente de variação inter-classe, permitindo a comparação entre as médias dos volumes de cada grupo de *spot* nos diferentes tratamentos (controle e infectado). Além da normalização realizada com auxílio dos genes controle, uma outra forma de se obter um coeficiente de normalização foi pela média global dos volumes relativos de todos os *spots* da membrana que pôde ser utilizada para calcular o coeficiente de normalização intra e inter-classe.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1. Hibridização das membranas de náilon com cDNAs marcados

A membrana de náilon contendo 96 seqüências de genes isolados da biblioteca de interação entre *M. pernicioso* e *T. cacao* foi hibridizada com sondas de cDNA como descrito nos itens 4. 2. 6 até 4. 2. 7 de Material e métodos, e o resultado de uma das Hibridizações está representado na Figura 4 .6.

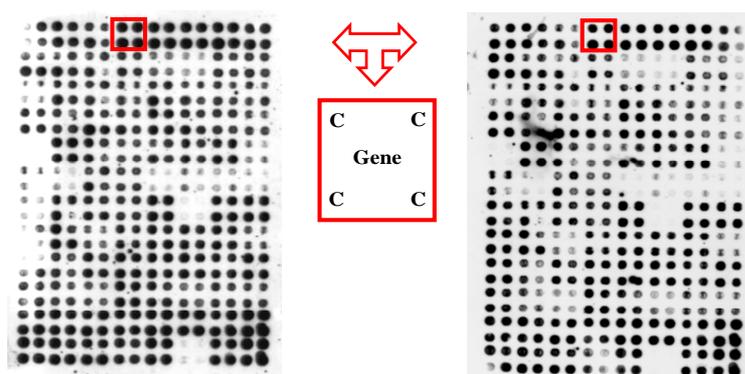


Figura 4.6 Auto-radiografias dos macro-arranjos contendo os produtos de PCR dos 96 clones da biblioteca de interação. Imagem digitalizada das membranas de náilon mostrando cada clone em quadruplicata na hibridização com a sonda controle (A) e com a sonda preparada do material infectado (B). Em destaque quatro replicas de um dos controles internos (beta tubulina).

A figura 4.6 mostra o perfil de expressão dos genes na membrana quando hibridizada com sonda controle e infectada. É possível observar que a hibridização não ocorreu em todos os pontos da membrana e que não é notável uma diferença visual entre os padrões de expressão dos genes entre as membranas. Por esse motivo, a utilização de um software capaz de quantificar essas diferenças torna-se imprescindível. Das 96 seqüências transferidas para o macroarranjo 7 foram desconsideradas por não apresentarem sinal detectável pelo programa, sendo assim, apenas 85.4 % das seqüências contidas no arranjo foram analisadas.

A escolha da utilização da marcação a frio em substituição à feita com fósforo radiativo, como descrito no item 4.2.6 do Material e métodos, é justificada pela utilização do mesmo protocolo no trabalho de Li, Osbone e Asiegbu (2006) que utilizaram o kit de marcação enzimática da GE healthcare (Alkaphos Direct Labelling™) para análise de expressão de genes diferencialmente expressos durante o desenvolvimento de *Heterobasidion parviporum* e obtiveram confirmação dos resultados por PCR em tempo real. Essa metodologia é mais acessível e barata e pode ser utilizada para obtenção de informações biológicas interessantes a partir de uma pequena população de clones de cDNAs em membranas de náilon, principalmente quando não se tem a possibilidade de realizar estudos em lamínas de vidro.

#### **4.3.2. Avaliação da qualidade da normalização**

Repetições do processo de hibridização são importantes, pois nos permite analisar a reprodutibilidade das interações individuais entre sonda e DNA alvo, possibilitando uma melhor normalização (HERWIG et al., 2001). Uma outra maneira de verificar variações no processo de hibridização e auxiliar na normalização dos dados é a utilização de réplicas do DNA alvo na membrana.

A normalização dos dados pode ser visualizada através de um gráfico de dispersão (*scatter plot*) das intensidades ou volumes relativos de diferentes experimentos antes e após a normalização. Na figura 4.7 é possível visualizar os scatter plots de duas hibridizações da sonda controle antes (Figura 4.7a) e após (Figura 4.7b) a normalização. A normalização melhora a dependência linear do sinal de hibridização e, desta forma, a confiabilidade entre as réplicas no experimento

(HERWIG et al., 2001). Tanto para normalização intraespecífica quanto para interespecífica o melhor coeficiente foi obtido considerando os valores das médias de todos os *spots* na membrana (média global), apresentando um melhor coeficiente de regressão linear (Figura 4.7b). Os coeficientes de normalização foram calculados como descrito a seguir:

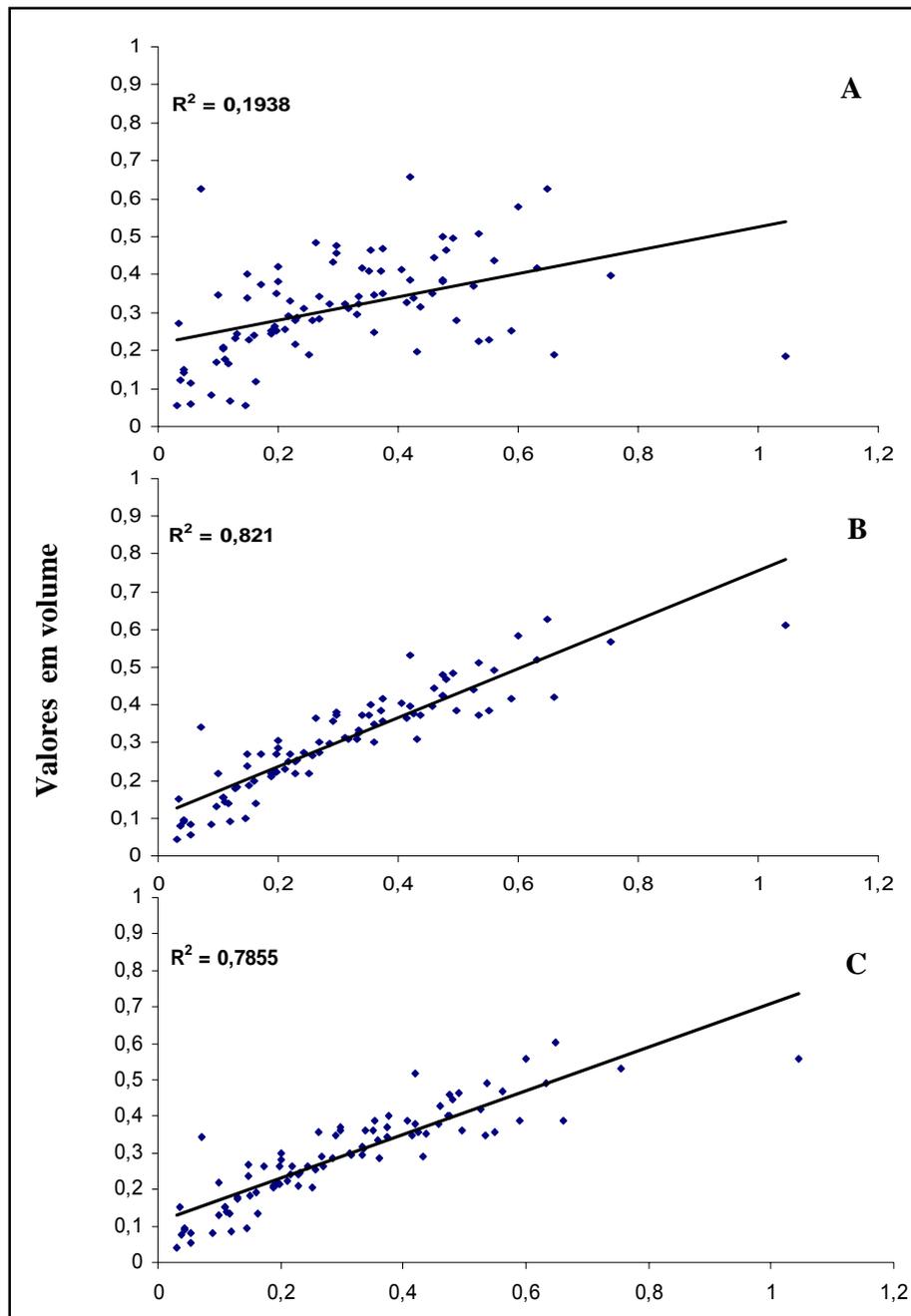


Figura 4.7. Scatter plot com os dados brutos de dois experimentos independentes das hibridizações feitas com a sonda controle (A). Scatter plot do mesmo experimento utilizando os dados da normalização global (B). E da normalização realizada com os coeficientes

obtidos dos genes controle (C). Os valores de  $R^2$  são referentes ao índice de regressão linear e o melhor valor é o que mais se aproxima de 1.

*Coefficiente de normalização para as duas replicas das hibridizações dentro do mesmo grupo (controle ou infectado), coeficiente de normalização **intra-classe**:*

$$C_{-ou-}I \Rightarrow \frac{\sum (x \% Vol 1)}{\sum (x \% Vol 2)}$$

Onde  $\sum (x \% Vol 1)$  é a média do somatório de todas as médias na membrana 1

e  $\sum (x \% Vol 2)$  é o somatório de todas as médias na membrana 2.

*A normalização foi efetuada da seguinte forma:*

$$Nc_{-ou-}Ni \Rightarrow \frac{(C_{-ou-}I \times \% Vol 2) + \% Vol 1}{2}$$

Onde *NC* (normalização nas membranas controle) ou *NI* (normalização nas membranas do material infectado) corresponde ao coeficiente de normalização intra-classe (C) multiplicado pelo valor do volume relativo de cada *spot* na membrana 2 (%Vol2) somado ao valor do volume relativo do *spot* correspondente na membrana 1 (%Vol1) e dividido por dois.

*Coefficiente de normalização entre as hibridizações de grupos diferentes (controle e infectado), coeficiente de normalização **inter-classe**:*

$$CI_{-ou-}IC \Rightarrow \frac{\sum Nc}{\sum Ni} \text{ ou } \frac{\sum Ni}{\sum Nc}$$

Onde  $\sum Nc$  e  $\sum Ni$  são o somatório das médias dos volumes relativos de cada *spot* nas membranas marcadas com as sondas controle e infectada após a normalização intra-específica.

*A normalização foi efetuada da seguinte forma:*

$$Nci_{-ou-}Nic \Rightarrow (Nc) \times IC_{-ou-} (Ni) \times CI$$

Onde *Nci* ou *Nic* são os valores normalizados entre as membranas marcadas com as sondas controle e infectada obtidos pela multiplicação do valor normalizado de cada *spot* (*Nc* ou *Ni*) pelo coeficiente de normalização interespecífico (*CI* ou *IC*).

O scattter plot dos volumes relativos da membrana controle e infectado após a normalização interespecífica pode ser visto na figura 4.8

O processo de normalização pode ser facilmente executado quando se trabalha com um volume de dados relativamente pequeno e com poucas repetições,

no entanto, quando o número de genes estudados é muito grande e são feitas mais de três repetições é recomendada a utilização de softwares ou pacotes estatísticos que forneçam uma análise mais apurada dos dados.

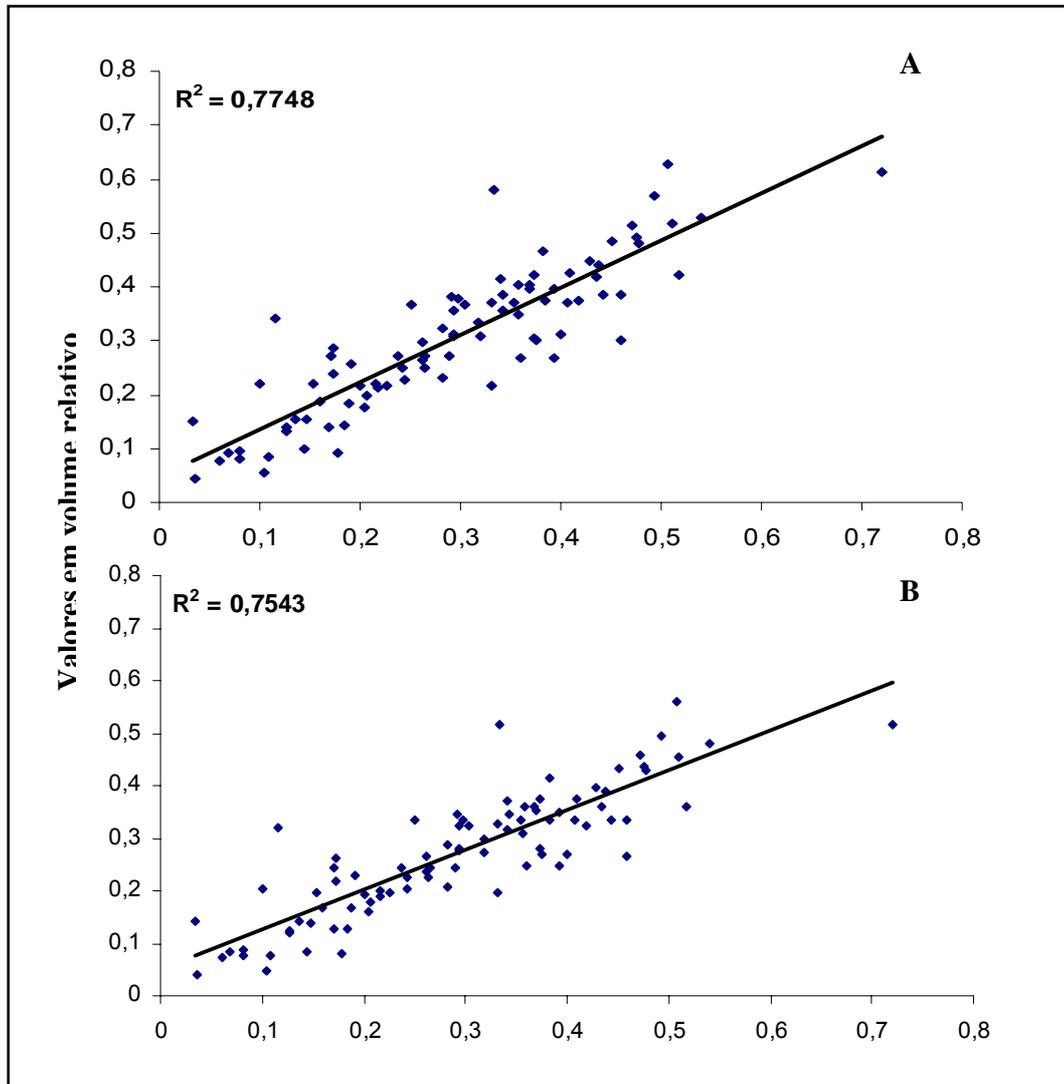


Figura 4.8. Scatter plot com os dados normalizados da membrana marcada com a sonda controle (eixo Y) e infectada (eixo X) após a normalização interespecífica global (A) e após a normalização interespecífica realizada com os coeficientes obtidos dos genes controle (B). O valor de  $R^2$  é referente ao índice de regressão linear.

### 4.3.3. Genes diferencialmente expressos

Depois de transcorridas as normalizações intraespecíficas e interespecíficas dos volumes relativos de cada *spot* na membrana, marcada com as diferentes sondas (controle e infectada), foi realizado o cálculo da taxa de expressão. A taxa de expressão foi obtida dividindo-se o volume relativo normalizado de cada *spot* marcado com a sonda do material infectado pelo volume relativo normalizado do mesmo *spot* marcado com a sonda do material controle. Os genes foram considerados diferencialmente expressos quando apresentavam uma taxa maior ou igual a 1.5 vezes, tanto para os genes ativados quanto para os reprimidos. O padrão do perfil de expressão para os 89 genes do macroarranjo pode ser visualizado na figura 4.9. Foram identificados 12 seqüências diferencialmente expressas dentre as 89 analisadas no experimento, ou seja, 10,68% dos genes selecionados apresentaram modificações no seu padrão de expressão durante a fase de infecção de *T. cacao* por *M. pernicioso* em que foi visualizada a produção de uma grande quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CEITA et al., 2007). Cinco genes apresentaram uma indução do padrão de expressão no tecido infectado, enquanto que outros seis foram reprimidos quando comparado o seu padrão de expressão ao obtido no material controle (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Expressão diferencial de genes em *T. cacao* induzida pela infecção por *M. pernicioso* em estágios avançados da doença.

Identificação do clone na Biblioteca	Anotação	Taxa de expressão*
UE-BINT-RT-001-029.F.fasta.seq_A07	NADPH oxidase	+1.58
UE-BINT-RT-001-053.F.fasta.seq_D07	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	+1.51
UE-BINT-SP-001-035.F.fasta.seq_E11	NADH-plastoquinona oxidoreductase sub unidade 3	+1.51
UE-BINT-SP-001-040.F.fasta.seq_A08	NADH-ubiquinona oxidoreductase	+1.59
UE-BINT-SP-001-017.F.fasta.seq_A08	F1 ATPase subunidade alpha	+1.98
UE-BINT-SP-001-061.F.fasta.seq_B10	Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase	+1.99
UE-BINT-RT-001-017.F.fasta.seq_D09	cytochrome-c oxidase	-1.67
UE-BINT-SP-001-005.F.fasta.seq_D09	NAD-dependent epimerase	-1.51
UE-BINT-SP-001-025.F.fasta.seq_F12	NADH_dehydrogenase	-4.27
UE-BINT-SP-001-035.F.fasta.seq_C02	Ferredoxin-NADP reductase	-1.59
UE-BINT-SP-001-047.F.fasta.seq_B03	ATP synthase alpha chain, mitochondrial	-2.8
UE-BINT-SP-001-054.F.fasta.seq_E04	Protopathogenesis-related_protein_5-1	-2.1

\* Taxa de expressão dos genes induzidos (+) e reprimidos (-).

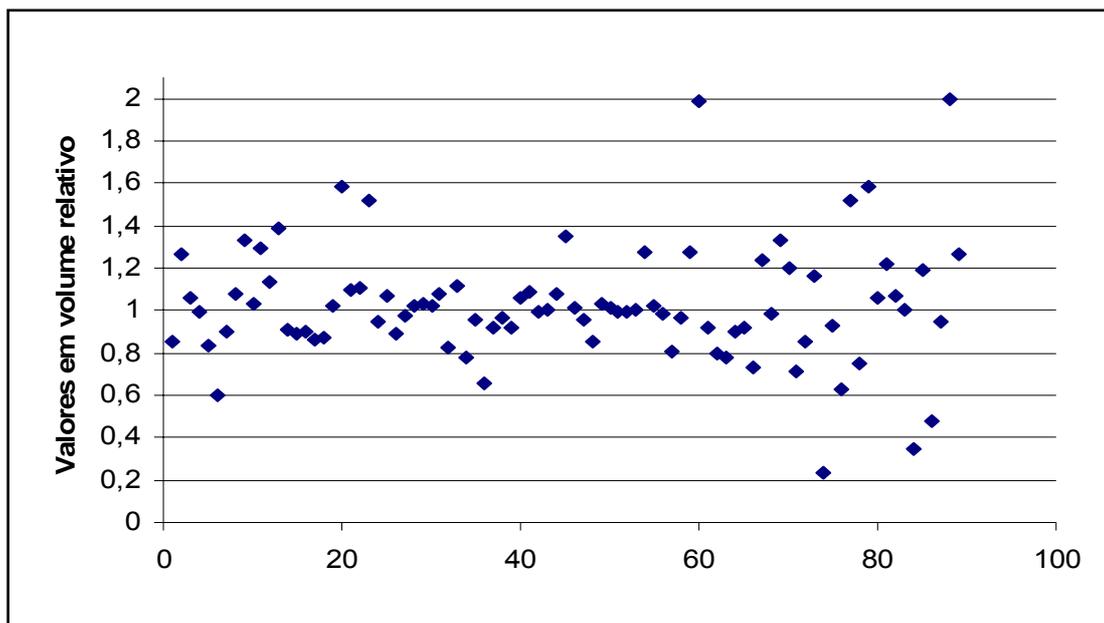


Figura 4.9. padrão de expressão dos 89 genes analisados do arranjo. Os genes considerados diferencialmente expressos são aqueles que estão fora da área grifada no gráfico. Os genes com taxa de expressão acima de 1,5 foram considerados ativados durante a infecção e aqueles abaixo de 0,65 foram considerados reprimidos.

Adicionalmente à atividade de produção de radical superóxido da NAD(P)H oxidase proposta por Doke (1983), a rápida produção de  $H_2O_2$ , disparada pelo ataque por patógenos e tratamento com elicitores, tem sido atribuída a sua atividade apoplástica de peroxidase (VERA-ESTRELLA et al., 1992). Peroxidases são encontradas no espaço apoplástico e são iônica ou covalentemente ligadas a polímeros da parede celular e podem atuar cataliticamente de duas formas. Quando ocorre disponibilidade de compostos fenólicos e peróxido de hidrogênio elas participam do ciclo peroxidativo e estão envolvidas com a síntese de lignina e de outros compostos fenólicos. Por outro lado, se ocorrer um acúmulo de NADPH ou de compostos reduzidos relacionados e diminuição dos fenólicos, inicia-se uma reação em cadeia que fornece as bases para geração de  $H_2O_2$  decorrente da atividade de peroxidase da NADH oxidase (CHEN & SCHOPFER, 1999). A presença de um motivo citoplasmático no qual o cálcio se liga a NADPH oxidases em plantas, sugere a possibilidade da regulação direta de sua atividade, através da percepção de flutuações subcelulares dos níveis de cálcio (ALLAN & FLUHR, 1997).

A participação de espécies ativas de oxigênio no processo de morte celular programada (PCD) durante a senescência em tecidos de plantas pode ser controlada pelos cloroplastos. Evidências do envolvimento dos cloroplastos na senescências de células vegetais são apresentadas no trabalho de Zapata e colaboradores (2005). Nesse trabalho os autores demonstraram que os genes que codificam a síntese de proteínas do complexo Ndh, que catalisa a redução da plastoquinona com auxílio do NADH, homólogo ao complexo I ou NADH dehidrogenase (EC: 1.6.5.3) da cadeia respiratória mitocondrial, são ativados durante o processo de senescência em plantas de *Nicotiniana tabacum*. A hipótese é fortemente suportada pelos altos níveis de malodialdeído (MDA), provenientes da peroxidação de lipídios encontrados em plantas de *N. tabacum* do tipo selvagem quando comparados a plantas transgênicas que tiveram o gene *ndhF* nocauteado.

Interessantemente, foi observado que durante o desenvolvimento da doença desencadeada pelo fungo *M. pernicioso* em *T. cacao*, ocorreu um aumento significativo dos níveis de MDA (SCARPARI et al., 2005). E em nosso estudo foi evidente o aumento nos níveis de expressão de alguns genes que codificam para síntese de proteínas relacionadas ao complexo Ndh dos cloroplastos a exemplo das NADH-oxidoreductases da ubiquinona e plastoquinona. O nível de expressão de uma NADH oxidase também foi induzido. Essas moléculas contribuem efetivamente na produção de espécies ativas de oxigênio e podem ser determinantes para a progressão da doença em *T. cacao*.

A enzima glicolítica gliceraldeído – 3 – fosfato dehidrogenase (GAPDH), possui numerosas funções secundárias bem caracterizadas em mamíferos, como proteína quinase, facilitadora da fusão da membrana, proteína de ligação à mRNA e em condições de estresse oxidativo atua como uma enzima de reparo ao DNA (MEYERSIEGLER et al., 1991). Recentemente GAPDH mostrou ser translocada do citosol para o núcleo sob condições de estresse, podendo desempenhar uma de suas funções secundárias (DASTOOR & DREYER, 2001). Também foi sugerido que o mesmo possa ocorrer com as mitocôndrias sob condições de estresse (SWEETLOVE et al., 2002). Nossos dados indicaram um aumento dos níveis de GAPDH no material infectado, e que possivelmente pode estar relacionado com as observações anteriormente descritas.

Foi observada uma diminuição dos níveis de expressão de genes como os da redutase da ferredoxina, que catalisa a produção de NADPH durante a fotossíntese (DENG et al., 1999); Algumas seqüências que codificam para síntese de genes mitocôndrias também tiveram sua síntese bastante reduzida, como os da oxidase do citocromo c e NADH desidrogenase, ambas envolvidas na fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e formação de ATP. A impossibilidade de produzir ATP é um fator determinante para o desencadeamento do processo de necrose (NAKAGAWA et al., 2005), desta forma, a mitocondrial pode desempenhar um papel fundamental na interação *T. cacao* e *M. pernicioso*.

Finalmente, os dados aqui apresentados são relevantes e podem contribuir de forma significativa para o melhor entendimento da interação entre *M. pernicioso* e *T. cacao*. É possível que genes do complexo Ndh de cloroplasto estejam envolvidos na senescência e morte celular em *T. cacao*, aja vista seu envolvimento na produção de MDA anteriormente descrito para *N. tabacum* e a indução também observada em *T. cacao*. O estudo da interação entre plantas transgênicas de tomate que apresentem mutações para proteínas do complexo Ndh e biótipos de *M. pernicioso* pode trazer dados esclarecedores acerca do seu envolvimento no desenvolvimento da doença.

#### 4.4. CONCLUSÕES

- A utilização da marcação a frio empregada no experimento demonstrou ser satisfatória para os estudos de macroarranjo.
- É possível que a NADPH oxidase esteja envolvida na formação de espécies ativas de oxigênio na vassoura-verde em estágio mais avançados, uma vez que foi evidente o aumento de sua expressão nesse período.
- Também existe a possibilidade da participação de enzimas do complexo Ndh de cloroplastos na formação de radicais superóxidos.
- Os resultados apresentados fornecem suporte para novas abordagens no que tange o estudo da interação entre *M. pernicioso* e *T. cacao* e devem ser levados em consideração no planejamento de novos experimentos.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARCIA, O.; MACÊDO, J. N. A. ; TIBÚRCIO, R.; ZAPAROLI, G. H. A.; RINCONES, J.; BITTENCOURT, L. M. C.; CEITA, G. O.; MICHELI, F.; GESTEIRA, A. S. ; MARIANO, A. C.; MEDRANO, F. J. ; MEINHARDT, L ; PEREIRA, G. G. A.; CASCARDO, J. C. M. Characterization of Necrosis and Ethylene inducing Proteins (NEP) in the Basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the Causal Agent of Witches Broom in *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v. 111, p. 443-455, 2007. (no prelo).

CEITA, G. O.; MACÊDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA, A. DA S.; MICHELI, F. ; MARIANO, A. C. ; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C .M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Crinipellis perniciosa*. **Plant Science**.2007. (no prelo).

CHEN, S. X.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions - A novel function of peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 3, Mar, p. 726-735. 1999.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, Jun 14, p. 826-833. 2001.

DASTOOR, Z.; DREYER, J. L. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 9, May, p. 1643-1653. 2001.

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**, v. 23, n. 3, p. 359-367. 1983.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, Jun, p. 515-523. 1980.

FIGUEIRA, A. Partial characterization of cacao pod and stem gums. **Carbohydr. Polym.** v. 24. p. 133-138. 1994.

GECHEV, T. S.; GADJEV, I. Z.; HILLE, J. An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 10, May, p. 1185-97. 2004.

GESTEIRA A. S.; MICHELI, F.; FERREIRA, C. F.; CASCARDO, J. C. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosa*. **Biotechniques**, v. 35, n. 3, Sep, p. 494-6, 498-500. 2003.

HERWIG, R.; AANSTAD, P.; CLARK, M.; LEHRACH, H. Statistical evaluation of differential expression on cDNA nylon arrays with replicated experiments. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 23, Dec 1, p. -. 2001.

LAWRENCE, J.S.; CAMPÊLO, A.M.F.L.; FIGUEIREDO, J.M. . Enfermidades do cacauero. II. Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotrópica**, v. 3, p. 1-14. 1991.

LI, G. S.; OSBORNE, J.; ASIEGBU, F. O. A macroarray expression analysis of novel cDNAs vital for growth initiation and primary metabolism during development of *Heterobasidion parviporum* conidiospores. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 8, Aug, p. 1340-1350. 2006.

MEYERSIEGLER, K.; MAURO, D. J.; SEAL, G.; WURZER, J.; DERIEL, J. K.; SIROVER, M. A. A Human Nuclear Uracil DNA Glycosylase Is the 37-Kda Subunit of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 19, Oct, p. 8460-8464. 1991.

NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, O.; OTSU, K.; YAMAGATA, H.; INOHARA, H.; KUBO, T.; TSUJIMOTO, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. **Nature**, v. 434, n. 7033, Mar 31, p. 652-8. 2005.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, v. 104, Jun, p. 671-675. 2000.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. **Annu Rev Phytopathol**, v. 34, p. 573-94. 1996.

ROCHA, H. M.; WHEELER, B. E. J. Factors Influencing the Production of Basidiocarps and the Deposition and Germination of Basidiospores of *Crinipellis pernicioso*, the Causal Fungus of Witches Broom on Cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 319-328. 1985.

ROS, B.; THUMMLER, F.; WENZEL, G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 3, May, p. 191-201. 2004.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, Jul, p. 995-1014. 2005.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A. W.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in

Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 413, Mar, p. 865-77. 2005.

SILVA, S. D. M. V., LUZ, E. D. M. N., GRAMACHO, K. P., ALBUQUERQUE, P. S. B.; BEZERRA, J. L. Standardization of the belt system method to assess cacao genotypes to witches' broom resistance. In: **Proceedings 13th International Cocoa Research Conference**, Kota Kinabalu, Malaysia, 2000.

SILVA, S.D.M.V.; MATSUOKA, K. . Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 54-59. 1999.

SMIRNOFF, N.; PALLANCA, J. E. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 24, n. 2, May, p. 472-8. 1996.

SWEETLOVE, L. J.; HEAZLEWOOD, J. L.; HERALD, V.; HOLTZAPFFEL, R.; DAY, D. A.; LEAVER, C. J.; MILLAR, A. H. The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. **Plant Journal**, v. 32, n. 6, Dec, p. 891-904. 2002.

VERA-ESTRELLA, R.; BLUMWALD, E.; HIGGINS, V. J. Effect of Specific Elicitors of *Cladosporium-Fulvum* on Tomato Suspension Cells - Evidence for the Involvement of Active Oxygen Species. **Plant Physiology**, v. 99, n. 3, Jul, p. 1208-1215. 1992.

WANG, E. RNA amplification for successful gene profiling analysis. **J Transl Med**, v. 3, Jul 25, p. 28. 2005.

ZAPATA, J. M.; GUERA, A.; ESTEBAN-CARRASCO, A.; MARTIN, M.; SABATER, B. Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 10, Oct, p. 1277-1284. 2005.

## 5.CONCLUSÕES GERAIS

A quantificação do ácido oxálico em *T. cacao* levou em consideração apenas a forma solúvel do ácido orgânico, desta forma como foi mostrado por Ceita et al., (2007) que ocorre um acúmulo de cristais de oxalato de cálcio durante o desenvolvimento da doença a quantificação do OxA presente nos cristais pode fornecer um padrão bem diferenciado ao observado nesse trabalho. Deve ser investigado se o observado por Li et al., (2003) em *P. stratiotes* pode estar ocorrendo nas diferentes variedades de cacau onde os autores isolaram proteínas associadas com a precipitação de cálcio e oxalato nos vacúolos dos idioblastos. Os autores observaram a participação de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático dos idioblastos no transporte de cálcio associado a elas ao vacúolo, via complexo de Golgi. Essa matriz orgânica envolvida na formação dos cristais demonstrou ter propriedades de ligação ao cálcio e ao OxA.

É possível que proteínas também estejam associadas aos cristais de oxalato em *T. cacao*, e desta forma, possuam um papel importante no processo da interação. O padrão de resposta para síntese dessas proteínas pode ser diferente nas variedades, o que explicaria as diferenças no acúmulo de cristais de oxalato de cálcio. E talvez seja um fator determinante da suscetibilidade na variedade catongo impedindo ou mascarando uma via de transdução de sinal mediada por cálcio ou oxalato. Desta forma a possibilidade da existência de proteínas associadas à formação e acúmulo de cristais de oxalato de cálcio em *T. cacao* doente precisa ser melhor investigada.

O padrão de resposta apresentado pelas variedades de cacau quanto à formação de  $H_2O_2$  também precisa ser estudado, uma vez que foram observadas respostas diferentes em ambas as variedades.

O envolvimento do AsA e compostos secundários originados de sua degradação na formação de oxalato e peróxido de hidrogênio é apontado por alguns autores (GREEN & FRY, 2005 & KÄRKÖNEN & FRY, 2006). A participação do AsA na formação do OxA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na variedade suscetível talvez possa ser corroborada pelo aumento dos níveis de AsA, mas por outro lado, não explica as variações de OxA e a formação de grandes quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observadas na variedade resistente, uma vez que não observamos alterações nos níveis de AsA.

O peróxido de hidrogênio detectado na variedade resistente na periferia do sistema vascular pode ter um papel importante na lignificação da parede celular e de certa forma, se constitui numa resposta decorrente do reconhecimento do patógeno que pode estar correlacionada com a ativação de genes de defesa.

O estudo de expressão diferencial de genes em tecidos infectado e sadio possibilitou a identificação de alguns genes como diferencialmente expressos, esse genes podem contribuir para futuras investigações no processo de interação e podem trazer contribuições importantes. Desta forma, os dados gerados com o macroarranjo são um ponto de partida para futuras investigações e permitiram estudos mais aprofundados. A taxa de expressão para todos os genes analisados no macroarranjo podem ser visualizados na tabela 7.1 dos anexos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

ALLAN, A. C.; FLUHR, R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. **Plant Cell**, v. 9, n. 9, Sep, p. 1559-1572. 1997.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399. 2004.

BARTH, C.; MOEDER, W.; KLESSIG, D. F.; CONKLIN, P. L. The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1. **Plant Physiol**, v. 134, n. 4, Apr, p. 1784-92. 2004.

BOLWELL, G. P.; BINDSCHEDLER, L. V.; BLEE, K. A.; BUTT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, May, p. 1367-1376. 2002.

BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Manganese Superoxide-Dismutase Can Reduce Cellular-Damage Mediated by Oxygen Radicals in Transgenic Plants. **Embo Journal**, v. 10, n. 7, Jul, p. 1723-1732. 1991.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E; F., JAMES; DAT, F.J.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction **Plant Science** v. 161, n. 3, p. 405-414. 2001.

CEITA, G. O.; MACÊDO, J. N. A.; SANTOS, T. B.; ALEMANNI, L.; GESTEIRA, A. DA S.; MICHELI, F. ; MARIANO, A. C. ; GRAMACHO, K. P.; SILVA, D. C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G. A. G.; CASCARDO, J. C .M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Crinipellis pernicioso*. Accepted **Plant Science**. 2007

CHEN, S. X.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions - A novel function of peroxidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 3, Mar, p. 726-735. 1999.

COBER, E. R.; RIOUX, S.; RAJCAN, I.; DONALDSON, P. A.; SIMMONDS, D. H. Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. **Crop Science**, v. 43, n. 1, Jan-Feb, p. 92-95. 2003.

CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B.; DEL RIO, L. A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 4, Apr, p. 145-150. 2001.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, Jun 14, p. 826-833. 2001.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 5, May, p. 779-795. 2000.

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H. J.; ZHONG, S. Q.; OLIVER, D. J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 17, n. 1, Jan, p. 268-281. 2005.

DESIKAN, R.; MACKERNESS, S. A. H.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 127, n. 1, Sep, p. 159-172. 2001.

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**, v. 23, n. 3, p. 359-367. 1983.

EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 74, Jun, p. 515-523. 1980.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; REID, A. P. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. **Plant Pathology**, v. 52, n. 4, Aug, p. 476-485. 2003.

FRAHRY, G.; SCHOPFER, P. NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed with a tetrazolium-based assay. **Planta**, v. 212, n. 2, Jan, p. 175-183. 2001.

FRANCESCHI, V. R. Calcium-Oxalate Formation Is a Rapid and Reversible Process in *Lemna-Minor-L*. **Protoplasma**, v. 148, n. 2-3, p. 130-137. 1989.

FRANCESCHI, V. R.; HORNER, H. T. A Microscopic Comparison of Calcium-Oxalate Crystal Idioblasts in Plant-Parts and Callus-Cultures of *Psychotria-Punctata* (Rubiaceae). **Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie**, v. 97, n. 5, p. 449-455. 1980.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annu Rev Plant Biol**, v. 56, p. 41-71. 2005.

FUJII, N.; WATANABE, M.; WATANABE, Y.; SHIMADA, N. Rate of Oxalate Biosynthesis from Glycolate and Ascorbic-Acid in Spinach Leaves. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 39, n. 4, Dec, p. 627-634. 1993.

GARRE, V.; TENBERGE, K. B.; EISING, R. Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: Putative role in pathogenicity and suppression of host defense. **Phytopathology**, v. 88, n. 8, Aug, p. 744-753. 1998.

GIACHETTI, E.; PINZAUTI, G.; BONACCORSI, R.; VINCENZINI, M. T.; VANNI, P. Isocitrate Lyase from Higher-Plants. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2439-2446. 1987.

GORDEEVA, A. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A.; LABAS, Y. A. Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. **Biochemistry-Moscow**, v. 68, n. 10, Oct, p. 1077-1080. 2003.

GOVRIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v. 10, n. 13, Jun 29, p. 751-757. 2000.

GRANT, J. J.; LOAKE, G. J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, v. 124, n. 1, Sep, p. 21-29. 2000.

GREEN, M. A.; FRY, S. C. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. **Nature**, v. 433, p. 83-87. 2005

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, Oct, p. 1773-91. 1996.

HEPLER, P. K.; WAYNE, R. O. Calcium and Plant Development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 397-439. 1985.

ISBELL, H. S.; FRUSH, H. L. Reactions of Carbohydrates with Hydroperoxides .11. Oxidation of L-Ascorbic-Acid by Hydrogen-Peroxide - Preparation of L-Threonic Acid. **Carbohydrate Research**, v. 72, Jul, p. 301-304. 1979.

KÄRKÖNEN, A.; FRY, S. C. Effect of ascorbate and its oxidation products on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, n. 8, p. 1633-1644. 2006.

KEATES, S. E.; TARLYN, N. M.; LOEWUS, F. A.; FRANCESCHI, V. R. L-Ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 4, Feb, p. 433-40. 2000.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M. R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends Plant Sci**, v. 6, n. 6, Jun, p. 262-7. 2001.

LANE, B. G. Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. **Faseb J**, v. 8, n. 3, Mar 1, p. 294-301. 1994.

LANE, B. G.; GRZELCZAK, Z. F.; KENNEDY, T. D.; KAJIOKA, R.; ORR, J.; DAGOSTINO, S.; JAIKARAN, A. Germin - Compartmentation of 2 Forms of the Protein by Washing Growing Wheat Embryos. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire**, v. 64, n. 10, Oct, p. 1025-1037. 1986.

LAWRENCE, J.S.; CAMPÊLO, A.M.F.L.; FIGUEIREDO, J.M. . Enfermidades do cacauzeiro. II. Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. **Agrotrópica**, v. 3, p. 1-14. 1991.

LI, X.; ZHANG, D.; LYNCH-HOLM, V. J.; OKITA T. W.; FRANCESCHI, V. R. Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cell. **Plant physiology**, Oct, v. 133, p. 549-559. 2003.

LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in Crop Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, n. 6, Nov-Dec, p.926-938. 1987.

LIU, H.; YANG, X.; ZHOU, L.; XU, H. [Study on effects of scutellarin on scavenging reactive oxygen]. **Zhong Yao Cai**, v. 25, n. 7, Jul, p.491-3. 2002.

LOPEZ-HUERTAS, E.; CHARLTON, W. L.; JOHNSON, B.; GRAHAM, I. A.; BAKER, A. Stress induces peroxisome biogenesis genes. **Embo Journal**, v. 19, n. 24, Dec 15, p. 6770-7. 2000.

MALAN, C.; GREYLING, M. M.; GRESSEL, J. Correlation between Cuzn Superoxide-Dismutase and Glutathione-Reductase, and Environmental and Xenobiotic Stress Tolerance in Maize Inbreds. **Plant Science**, v. 69, n. 2, p. 157-166. 1990.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C.; GIL-AD, N. L. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry**, v. 58, n. 1, Sep, p. 33-41. 2001.

MAZEN, A. M. A.; ZHANG, D. Z.; FRANCESCHI, V. R. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. **New Phytologist**, v. 161, n. 2, Feb, p. 435-448. 2004.

MEINHARDT, L. W.; BELLATO CDE, M.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R. A.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Curr Microbiol**, v. 52, n. 3, Mar, p. 191-6. 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, v. 7, n. 9, Sep, p. 405-10. 2002.

MORI, T. A.; WOODMAN, R. J.; BURKE, V.; PUDDEY, I. B.; CROFT, K. D.; BEILIN, L. J. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 7, Oct 1, p. 772-81. 2003.

MUNIR, E.; YOON, J. J.; TOKIMATSU, T.; HATTORI, T.; SHIMADA, M. A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, Sep 25, p. 11126-11130. 2001.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, v. 164, n. 6, Jun, p. 901-909. 2003.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: Their association with lignification. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 10, Oct, p. 1118-1126. 1997.

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. **Plant Cell**, v. 6, n. 1, Jan, p. 65-74. 1994.

PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. **Annu Rev Phytopathol**, v. 34, p. 573-94. 1996.

RAVEN, J. A.; GRIFFITHS, H.; GLIDEWELL, S. M.; PRESTON, T. The Mechanism of Oxalate Biosynthesis in Higher-Plants - Investigations with the Stable Isotopes O-18 and C-13. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 216, n. 1202, p. 87-101. 1982.

RAVEN, J. A.; SMITH, F. A. Nitrogen Assimilation and Transport in Vascular Land Plants in Relation to Intracellular Ph Regulation. **New Phytologist**, v. 76, n. 3, p. 415-431. 1976.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, Jul, p. 995-1014. 2005.

SCARPARI, L. M.; MEINHARDT, L. W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A. W.; SCHIAVINATO, M. A.; CASCARDO, J. C.; PEREIRA, G. A. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*a. **J Exp Bot**, v. 56, n. 413, Mar, p. 865-77. 2005.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiol**, v. 125, n. 4, Apr, p. 1591-602. 2001.

SILVA, S.D.M.V.; MATSUOKA, K. . Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 54-59. 1999.

SIMPSON, G. L. W.; ORTWERTH, B. J. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1501, n. 1, Apr 15, p. 12-24. 2000.

SMIRNOFF, N. L-ascorbic acid biosynthesis. **Vitam Horm**, v. 61, p. 241-66. 2001.

SMIRNOFF, N.; WHEELER, G. L. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 4, p. 291-314. 2000.

SRIVASTAVA, S. K.; KRISHNAN, P. S. Oxalate content of plant tissues. **Journal of Science industri. Res.**, n. 18C, p. 146-148. 1959.

STICHER, L.; PENEL, C.; GREPPIN, H. Calcium Requirement for the Secretion of Peroxidases by Plant-Cell Suspensions. **Journal of Cell Science**, v. 48, Apr, p. 345-353. 1981.

VANACKER, H.; CARVER, T. L. W.; FOYER, C. H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. **Plant Physiology**, v. 123, n. 4, Aug, p. 1289-1300. 2000.

VERA-ESTRELLA, R.; BLUMWALD, E.; HIGGINS, V. J. Effect of Specific Elicitors of *Cladosporium-Fulvum* on Tomato Suspension Cells - Evidence for the Involvement of Active Oxygen Species. **Plant Physiology**, v. 99, n. 3, Jul, p. 1208-1215. 1992.

VIANELLO, A.; MACRI, F. Generation of Superoxide Anion and Hydrogen-Peroxide at the Surface of Plant-Cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23, n. 3, Jun, p. 409-423. 1991.

VOLK, G. M.; LYNCH-HOLM, V. J.; KOSTMAN, T. A.; GOSS, L. J.; FRANCESCHI, V. R. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. **Plant Biology**, v. 4, n. 1, Jan, p. 34-45. 2002.

VOLKOV, R. A.; PANCHUK, II; MULLINEAUX, P. M.; SCHOFFL, F. Heat stress-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. **Plant Mol Biol**, v. 61, n. 4-5, Jul, p. 733-46. 2006.

WAGNER, G.; LOEWUS, F. Biosynthesis of L-Ascorbic-Acid and (+)-Tartaric Acid in *Pelargonium-Crispum*. **Plant Physiology**, v. 51, p. 48-48. 1973.

WEI, Y. D.; SHEN, W. Y.; DAUK, M.; WANG, F.; SELVARAJ, G.; ZOU, J. T. Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient

from host plant to fungal pathogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, Jan 2, p. 429-435. 2004.

WHEELER, G. L.; JONES, M. A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**, v. 393, n. 6683, May 28, p. 365-9. 1998.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VANMONTAGU, M.; INZE, D.; VANCAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **Embo Journal**, v. 16, n. 16, Aug 15, p. 4806-4816. 1997.

## 7.0 ANEXOS

Tabela 7.1. Tabela mostrando os valores das taxas de expressão de todas as seqüências do macroarranjo, o número de cada clone e o resultado do blast também pode ser visualizado na tabela.

Clone ID	SPOT ID	Taxa de expressão	Resultado do BLAST
UE-BINT-SP-001-013.F.fasta.seq_A10	E06	1,00	[Cu/Zn]superóxido dismutase SOD
UE-BINT-SP-001-011.F.fasta.seq_E03	E02	1,03	AAA-type_ATPase_family_protein
UE-BINT-SP-001-015.F.fasta.seq_C10	E10	0,98	ABC_transporter_family_protein
UE-BINT-RT-001-030.F.fasta.seq_H02	A01	0,85	Alfa tubulina
UE-BINT-SP-001-018.F.fasta.seq_C05	F05	0,79	allergenic_isoflavone_reductase-like_protein
UE-BINT-SP-001-022.F.fasta.seq_H10	G03	1,20	Ascorbato peroxidase
UE-BINT-SP-001-046.F.fasta.seq_B10	H03	1,07	ATP sintase CF0
UE-BINT-SP-001-047.F.fasta.seq_B03	H05	0,35	ATP sintase mitocondrial
UE-BINT-SP-001-008.F.fasta.seq_G05	D09	1,08	ATPase 4 transportadora de cálcio do RE
UE-BINT-RT-001-012.F.fasta.seq_G07	A10	1,33	ATPase exportadora de cobre responsiva a antagonistas
UE-BINT-SP-001-014.F.fasta.seq_G02	E09	1,03	ATPase exportadora de H <sup>+</sup>
UE-BINT-SP-001-011.F.fasta.seq_H02	E05	0,99	ATPase transportadora de prótons do vacúolo
UE-BINT-RT-001-016.F.fasta.seq_A07	B05	0,90	Beta subunidade da piruvato desidrogenase
UE-BINT-RT-001-008.F.fasta.seq_C02	D12	0,95	Beta tubulina
UE-BINT-RT-001-004.F.fasta.seq_C04	A03	1,06	Chaperona associada a cobre
UE-BINT-RT-001-028.F.fasta.seq_B11	B08	1,02	Chaperona hsc 70
UE-BINT-RT-001-053.F.fasta.seq_D07	B12	1,52	Ciclofilina
UE-BINT-SP-001-004.F.fasta.seq_H07	C08	1,07	Ciclofilina/ cis-trans isomerase
UE-BINT-RT-001-010.F.fasta.seq_F06	A09	1,08	Clp protease 2_subunidade proteolitica
UE-BINT-RT-001-014.F.fasta.seq_D07	A11	1,03	Citocromo b559_pcbE
UE-BINT-RT-001-005.F.fasta.seq_G09	A05	0,84	Citocromo b6
UE-BINT-RT-001-060.F.fasta.seq_C08	C04	0,97	Citocromo f
UE-BINT-RT-001-051.F.fasta.seq_G08	B10	1,09	Citocromo P450
UE-BINT-SP-001-008.F.fasta.seq_E02	D08	1,00	Citocromo P450 induzido por elicitor
UE-BINT-SP-001-035.F.fasta.seq_E11	G10	1,52	Complexo 3 da NAD(P)H-quinona oxidoreductase cloroplastídica
UE-BINT-SP-001-001.F.fasta.seq_H01	C07	1,02	Dehidoascorbato redutase dependente de GSH
UE-BINT-SP-001-044.F.fasta.seq_F01	H01	1,06	dehidrogenase/redutase (SDR)
UE-BINT-RT-001-060.F.fasta.seq_E03	D10	1,35	Desconhecido
UE-BINT-SP-001-023.F.fasta.seq_C08	G04	0,71	Desconhecido
UE-BINT-SP-001-005.F.fasta.seq_D09	D01	0,66	Epimerase/dehidratase dependente de NAD
UE-BINT-SP-001-018.F.fasta.seq_G12	F07	0,78	Família de proteína de ligação ao cálcio
UE-BINT-SP-001-011.F.fasta.seq_E10	E03	1,01	Família de proteínas com repetições de anquirina
UE-BINT-SP-001-023.F.fasta.seq_G10	G05	0,86	Fator de maturação do proteossoma UMP1
UE-BINT-SP-001-016.F.fasta.seq_C07	E12	0,97	GDP-D-mannose_4,6-dehidratase
UE-BINT-SP-001-061.F.fasta.seq_B10	H11	2,00	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
UE-BINT-RT-001-004.F.fasta.seq_A01	A02	1,27	Glicose -6-fosfato desidrogenase citoplasmática
UE-BINT-SP-001-017.F.fasta.seq_D08	F04	0,92	glicose-6-fosfato-1-dehidrogenase G6PD

UE-BINT-SP-001-019.F.fasta.seq_E07	F10	0,73	Glutationa S transferase U1
UE-BINT-SP-001-020.F.fasta.seq_F05	G01	0,99	H+-transporting_two-sector_ATPase_(EC_3.6.3.14)
UE-BINT-RT-001-055.F.fasta.seq_G11	C02	1,07	Inibidor da cisteina proteinase
UE-BINT-SP-001-019.F.fasta.seq_E04	F09	0,91	Inibidor de protease de semente/ LTP
UE-BINT-SP-001-016.F.fasta.seq_A09	E11	0,81	isochorismatase_hydrolase_family_protein
UE-BINT-RT-001-015.F.fasta.seq_F08	B02	1,39	Isocitrato dehidrogenase dependente de NADP
UE-BINT-SP-001-007.F.fasta.seq_E12	D06	1,09	Lactoilglutationa liase
UE-BINT-SP-001-061.F.fasta.seq_B06	H10	0,95	Metalotioneina (MT-2)
UE-BINT-SP-001-044.F.fasta.seq_H08	H02	1,22	monodehidroascorbato redutase
UE-BINT-SP-001-033.F.fasta.seq_E04	G08	0,93	NADH dehidrogenase subunidade 2
UE-BINT-SP-001-006.F.fasta.seq_H01	D04	0,92	NADH2 dehidrogenase (ubiquinona)
UE-BINT-SP-001-040.F.fasta.seq_A08	G12	1,59	NADH-ubiquinona oxidoreductase
UE-BINT-SP-001-046.F.fasta.seq_H08	H04	1,00	NADH-ubiquinona oxidoreductase
UE-BINT-SP-001-061.F.fasta.seq_C04	H12	1,27	NADH-ubiquinona oxidoreductase 20 kDa
UE-BINT-SP-001-035.F.fasta.seq_C02	G09	0,63	NADP+ redutase da ferredoxina
UE-BINT-RT-001-029.F.fasta.seq_A07	B09	1,59	NADPH oxidase
UE-BINT-RT-001-017.F.fasta.seq_D09	B06	0,86	Oxidase do citocromo c
UE-BINT-RT-001-007.F.fasta.seq_C10	A06	0,60	Oxidoreductase
UE-BINT-SP-001-019.F.fasta.seq_A05	F08	0,90	Peptidilproliu isomerase Cyp
UE-BINT-SP-001-009.F.fasta.seq_E06	C11	0,78	Peroxidase
UE-BINT-SP-001-014.F.fasta.seq_F09	E08	1,28	Peroxidase da glutationa
UE-BINT-RT-001-014.F.fasta.seq_G05	A12	1,30	Peroxidase de classe III
UE-BINT-RT-001-052.F.fasta.seq_G11	B11	1,10	Peroxiredoxina cloroplastídica 2-cys
UE-BINT-RT-001-014.F.fasta.seq_H05	B01	1,14	Polifenol oxidase
UE-BINT-RT-001-060.F.fasta.seq_G05	C05	1,03	Precursor cloroplastídeo da [Cu-Zn] SOD
UE-BINT-RT-001-015.F.fasta.seq_H05	B04	0,89	Precursor cloroplastídeo da polifenol oxidase
UE-BINT-SP-001-009.F.fasta.seq_H07	E01	0,85	Precursor da gemim E
UE-BINT-RT-001-008.F.fasta.seq_G01	A07	0,90	Precursor mitocondrial de uma proteína de choque térmico de 70KD
UE-BINT-SP-001-008.F.fasta.seq_C08	D07	1,00	Probable_26S_proteasome_non-ATPase_regulatory_subunit_3
UE-BINT-SP-001-021.F.fasta.seq_F06	G02	1,33	Proteína associada a patogenicidade PR 4B
UE-BINT-SP-001-054.F.fasta.seq_E04	H09	0,48	Proteína associada a patogenicidade PR 5
UE-BINT-SP-001-005.F.fasta.seq_D12	D02	0,92	Proteína associada a senescência
UE-BINT-SP-001-006.F.fasta.seq_B10	D03	0,97	Proteína de 22kDa da membrana dos peroxissomos
UE-BINT-SP-001-036.F.fasta.seq_F07	G11	0,75	Proteína de choque termico 90
UE-BINT-SP-001-020.F.fasta.seq_D01	F12	1,24	Proteína de transferência de energia mitocondrial
UE-BINT-SP-001-005.F.fasta.seq_D01	C12	0,96	Proteína ribossomal S18
UE-BINT-RT-001-015.F.fasta.seq_G02	B03	0,91	Proteína rica em hidroxiprolina
UE-BINT-SP-001-025.F.fasta.seq_F12	G07	0,23	Provável NADH dehidrogenase subunidade 4 ND
UE-BINT-SP-001-011.F.fasta.seq_E11	E04	0,99	Provável glutationa S-transferase
UE-BINT-SP-001-016.F.fasta.seq_H03	F02	1,27	Provável HSP70
UE-BINT-SP-001-009.F.fasta.seq_G01	C10	1,12	Relacionado ao inibidor do proteosoma
UE-BINT-SP-001-017.F.fasta.seq_A08	F03	1,99	Subunidade alfa da F1 ATPase
UE-BINT-SP-001-047.F.fasta.seq_G06	H06	1,19	Subunidade C da ATP sintase do vacúolo

UE-BINT-RT-001-053.F.fasta.seq_H11	C01	0,95	(VATC) Subunidade catalítica da H+ATPase vacuolar
UE-BINT-RT-001-005.F.fasta.seq_F01	A04	1,00	Subunidade D ATP sintase (VATD)
UE-BINT-SP-001-024.F.fasta.seq_G11	G06	1,16	Subunidade delta da F1 ATPase
UE-BINT-SP-001-005.F.fasta.seq_B05	C09	0,82	Subunidade G da ATP sintase mitocondrial
UE-BINT-SP-001-009.F.fasta.seq_G02	D11	1,01	Superoxide dismutase (SOD)
UE-BINT-RT-001-057.F.fasta.seq_A05	C03	0,89	suppressor of K+ transport growth defect-like protein
UE-BINT-SP-001-007.F.fasta.seq_C05	D05	1,06	Translocase da membrana mitocondrial
UE-BINT-SP-001-001.F.fasta.seq_E11	C06	1,03	Translocase mitocondrial TM17-2
UE-BINT-RT-001-019.F.fasta.seq_A06	B07	0,87	Ubiquinol Ubiquinol citocromo c reductase