

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO DE INDUTORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO CONTROLE DA
FERRUGEM DO EUCALIPTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO**

LEONARDO PIRES BOAVA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Maio, 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**AÇÃO DE INDUTORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO CONTROLE DA
FERRUGEM DO EUCALIPTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E
EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO**

LEONARDO PIRES BOAVA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Maio, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B662a Boava, Leonardo Pires, 1977-
Ação de indutores bióticos e abióticos no controle da ferrugem do eucalipto, atividades enzimáticas e expressão gênica durante o processo de infecção / Leonardo Pires Boava. - Botucatu : [s.n.], 2008.
ix, 181 f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008

Orientador: Edson Luiz Furtado

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Resistência. 2. Puccinia psidii. 3. Enzimas - Indução. 4. Eucalipto. 5. Biologia molecular. I. Furtado, Edson Luiz. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

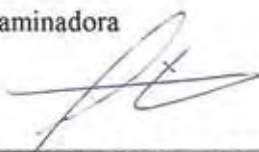
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AÇÃO DE INDUTORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO CONTROLE DA
FERRUGEM DO EUCALIPTO, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EXPRESSÃO
GÊNICA DURANTE O PROCESSO DE INFECÇÃO"

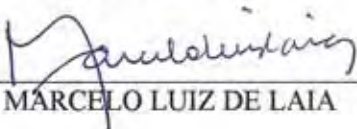
ALUNO: LEONARDO PIRES BOAVA

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

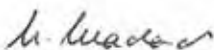
Aprovado pela Comissão Examinadora



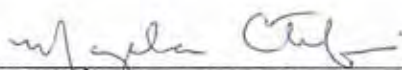
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



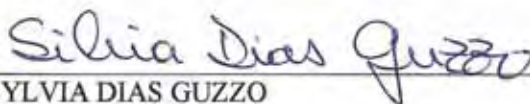
PROF. DR. MARCELO LUIZ DE LAIA



DR. MARCOS ANTONIO MACHADO



DRª MARIÂNGELA CRISTOFANI YALI



DRª SYLVIA DIAS GUZZO

Data da Realização: 27 de maio de 2008.

A minha amada esposa Joice por
todo companheirismo, por toda
compreensão e por todo o amor

Meus Irmãos Nelsinho e Alex, ao meu
grande amigo Gustavo Abrão

Aos meus queridos pais, Nelson e
Luiza pelo amor e apoio recebido ao
longo da minha vida

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado pela orientação, ensinamentos, incentivos e confiança depositada ao longo da minha formação, a quem tenho grande admiração.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati pelo aprendizado e disponibilização das estruturas do laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP.

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela disponibilização das estruturas do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP/Jaboticabal e todo aprendizado.

À Profa. Dra. Sônia Marli Zingaretti pelo apoio e confecção das membranas de macroarranjo pelo Brazilian Clone Collection Center (BCCC) FCAV/UNESP/Jaboticabal.

À equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel (VCP), por cederem material contrastante para este estudo, na pessoa de Cezar Bonine e Donizete C. Dias.

Ao Dr. Odair José Kunh do laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP pelas contribuições, apoio e ensinamentos.

À Karina Maia Dabbas do LBM do FCAV/UNESP/Jaboticabal pela dedicação, apoio incondicional e contribuições para realização do trabalho.

Ao Dr. Marcelo Luiz de Laia do LBM do FCAV/UNESP/Jaboticabal pelo apoio, conselhos e contribuições na execução do trabalho.

A todos os Professores do Departamento de Defesa Fitossanitária do curso de Proteção de Planta da FCA/UNESP/Botucatu, em especial ao Prof. Dr. Nilton Luiz de Souza (*in memoriam*) pelos ensinamentos e contribuições.

Ao Prof. Dr. Yodiro Masuda, Dr. Amauri Siviero, Dra. Mariangela Cristofani-Yali, Dr. Marcos Antonio Machado, Prof. Dr. Alfredo Seiiti Urashima e Profa. Dra. Marineide Mendonca Aguilera, que contribuíram diretamente para minha formação.

A todos os amigos de curso da FCA/UNESP/Botucatu, em especial a Cecília (Virola), Helenize (Juá), Daniel (Tanque), Baseto, Clandestino, Renata, Carlos Demant e Karina.

A toda equipe do LBM do FCAV/UNESP/Jaboticabal, Dani, Flavinha, Jú (Lolita), Flavia, Fabiana, Gustavo, Fabrício, Poliana, Tiago, Elaine, Gi, Julinho, Rafael, Braz (Bahia), Renata, Agda e Angela pelo aprendizado e momentos compartilhados.

A toda a equipe do laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP. Nívea, Maurício, André, Ricardo, Solange, Patrícia Cia, Leonardo Toffano, Maria Cristina, Marizete Dirceu e Ely.

Aos funcionários da FCA/UNESP/Botucatu, do laboratório de Fisiologia de Bioquímica de Plantas da ESALQ-USP e do LBM do FCAV/UNESP/Jaboticabal.

Aos meus amigos Dametto, Paula, Vandinho, Andrea, Vinícius (Lemão), Aline, Rafael (Étu), Fernanda (Guimis), Pedro, Cláudia, Vanderlei, Renata, Gustavo, Fernando, Henrique Ré, Elton, Tavinho, Leandro (Brancão), Gustavo Abrão, Adriana Crotti, Erezil, Milena e meu primo Giovanni e família.

Aos meus sogros Sr. Carlos e Sra. Maria Dalva, meu cunhado Felipe e a todos os meus familiares.

A FAPESP pela bolsa concedida para realização desse trabalho e de todos os outros desde a iniciação científica, pelo valioso incentivo e apoio à pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que se tornasse possível a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
SUMMARY	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	8
2.2 Histórico e importância econômica da cultura do eucalipto.....	9
2.3 A ferrugem do eucalipto	13
2.4 Interação planta–patógeno.....	18
2.5 Indução de resistência.....	25
2.6 Genômica funcional.....	31
2.7 Projetos de genômica com eucalipto	36
CAPITULO I.....	38
Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por <i>Puccinia psidii</i> em eucalipto	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
Cultivo e manutenção das plantas	43
Tratamento com indutores bióticos e abióticos	43
Obtenção e manutenção do patógeno, método de inoculação e avaliação	44
Determinação das atividades enzimáticas	45
Obtenção dos extratos protéicos.....	46
Metodologia para determinação da atividade de quitinase.....	46
Metodologia para determinação da atividade de peroxidase.....	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
Efeito dos indutores de resistência	47
Atividade de quitinase	50
Atividade de peroxidase	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

CAPÍTULO II.....	62
Atividade de quitinase e peroxidase em folhas de eucalipto com diferentes estágios de desenvolvimento após inoculação com <i>Puccinia psidii</i> e tratamento com Acibenzolar-S-metil (ASM).....	63
RESUMO	63
ABSTRACT	64
INTRODUÇÃO.....	64
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
Material vegetal, tratamento com indutor de resistência e inoculação.....	66
Obtenção dos extratos protéicos.....	67
Determinação da atividade de quitinase	67
Determinação da atividade de peroxidase	68
Delineamento experimental.....	68
RESULTADOS	69
Atividade de quitinase	69
Atividade de peroxidase	70
DISCUSSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
CAPÍTULO III	79
Efeito de Acibenzolar-S-metil (ASM) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na ativação de defesas do eucalipto contra a ferrugem.....	80
RESUMO	80
ABSTRACT	81
INTRODUÇÃO.....	81
MATERIAL E MÉTODOS.....	84
Cultivo e manutenção das plantas e tratamento com indutores de resistência.....	84
Obtenção e manutenção do patógeno e método de inoculação	84
Determinação das atividades enzimáticas	85
Delineamento experimental.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
Efeito dos indutores na severidade da doença.....	88

Atividade de quitinase	90
Atividade de peroxidase	93
Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL)	95
Atividade de polifenoloxidasas	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CAPÍTULO IV	106
<i>Eucalyptus</i> ESTs involved in the mechanisms against plant pathogen and environmental stresses	107
ABSTRACT	107
RESUMO	108
MATERIAL AND METHODS.....	110
RESULTS AND DISCUSSION.....	111
Cell surface communications and signaling system.....	111
Detoxification genes and species reactivate of oxygen.....	117
Phytoalexins	119
Pathogenesis-related proteins (PR-Proteins)	120
REFERENCE	127
CAPÍTULO V	135
Expressão diferencial (“macroarray”) de genes relacionados ao metabolismo de defesa de eucalipto quando inoculados com <i>Puccinia psidii</i> e tratados com Acibenzolar-S-metil	136
RESUMO	136
ABSTRACT	137
INTRODUÇÃO.....	138
MATERIAL E MÉTODOS.....	140
Delineamento experimental.....	141
Extração de RNA total.....	142
Síntese de cDNA	142
Seleção das ESTs (Expressed Sequence Tag)	143
Preparação das membranas para macroarranjo	144
Metodologia de marcação com quimiluminescência e hibridização	144
Análise dos macroarranjo e análises estatísticas	146

RESULTADOS	147
Normalização dos dados	147
Expressão gênica após inoculação com <i>Puccinia psidii</i>	148
Expressão gênica após tratamento com Acibenzolar-S-metil e inoculação com <i>Puccinia psidii</i>	152
DISCUSSÃO	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
3 CONCLUSÕES GERAIS	168
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170

RESUMO

A ferrugem causada por *Puccinia psidii* é uma das principais doenças do eucalipto no Brasil, provocando prejuízos em viveiros e no campo. Ataca plantas jovens com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros como primórdios foliares e terminais de galhos. A resistência genética é apontada como a melhor opção para o controle da doença, mesmo em genótipos suscetíveis é possível ativar os mecanismos de resistência por meio de tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como 'indução de resistência'. Com o objetivo de estudar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de defesa do eucalipto contra *P. psidii*, quatro ensaios foram executados com mudas de dois genótipos híbridos (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) denominados VR e C0. No primeiro ensaio, mudas foram tratadas com Acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos, *Saccharomyces cerevisiae*, Dipel, Ecolife⁴⁰ e Crop-set, cinco dias antes da inoculação com o patógeno. A severidade da doença foi estimada 15 dias após a inoculação por meio de comparação com uma escala de notas. Nos tratamentos mais eficientes analisou-se a atividade das enzimas quitinase e peroxidase, 48 horas após inoculação (h.a.i). No segundo ensaio as mudas foram tratadas com ASM cinco dias antes da inoculação e a atividade de peroxidase e quitinase foi determinada 0, 24, 72 e 96 h.a.i nas folhas em diferentes estágios de desenvolvimento (1º, 2º e 4º pares). No terceiro ensaio a ação dos indutores ASM e *S. cerevisiae*, aplicados cinco dias antes da inoculação, foi correlacionada com possíveis alterações bioquímicas nas plantas. A atividade de quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase (FAL) e polifenoloxidase em folhas do 1º e 2º pares coletadas em 5 períodos 0, 24, 48, 72

e 96 h.a.i. foi determinada. Finalmente, no quarto ensaio foi analisado o padrão de expressão gênica ao longo do tempo em mudas de ambos os genótipos após tratamento com ASM e, após 5 dias, inoculação com *P. psidii*, em cinco períodos (0, 24, 48, 72 e 96 h.a.i.), por meio da técnica de “macroarray”. No primeiro ensaio verificou-se que os tratamentos ASM, *S. cerevisiae* e Ecolife foram mais eficientes no controle da ferrugem. Verificou-se também um aumento da atividade de quitinase e peroxidase, em ambos os genótipos, quando tratados com ASM e *S. cerevisiae*. No segundo ensaio os resultados evidenciaram que o efeito do ASM ou a ação de *P. psidii* contribuíram para alterações nos níveis das enzimas apenas nas folhas em desenvolvimento (1° e 2° pares), sendo observado maiores incrementos em plantas do clone VR 72 h.a.i., previamente tratadas com ASM. No terceiro ensaio foi verificada diferenças de atividade de quitinase, peroxidase e FAL em ambos os clones, seja pela ação do patógeno, pelo efeito dos indutores de resistência ou ainda pela interação entre indutor-patógeno. No quarto ensaio, nas plantas do clone VR, diversos genes relacionados ao fortalecimento da parede celular, polarização celular, proteínas-RP, enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides e na peroxidação de lipídios, acúmulo de compostos fenólicos, dentre outros, se mostraram diferencialmente expressos quando as plantas foram desafiadas pelo patógeno, quando apenas foram tratadas com o indutor de resistência ou em plantas previamente tratadas com indutor seguida de inoculação. Entretanto, em plantas do genótipo CO somente houve expressão diferencial quando as plantas foram tratadas com ASM.

Palavras-chave: indução da resistência, ferrugem das mirtáceas, quitinase, proteínas-RP, macroarrays.

BIOTICS AND ABIOTICS INDUCERS FOR EUCALYPTUS RUST CONTROL, ENZYMATIC ACTIVITY AND GENE EXPRESSION DURING THE INFECTION PROCESS. Botucatu, 2008. 181p. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LEONARDO PIRES BOAVA

Adviser: EDSON LUIZ FURTADO

SUMMARY

The rust caused by *Puccinia psidii* is a major disease of *Eucalyptus* in Brazil, causing losses in nurseries and in the field. Attacks occur in young plants with less than two years old, always in new branches and new leaves. The genetic resistance is recognized how the best option for disease control. Nevertheless the susceptible genotypes is possible to activate the resistance mechanisms through treatment with biotic and abiotic agents. In order to study the biochemical and molecular mechanisms involved in the process of *Eucalyptus* defense against *P. psidii* four assays were carried out with two seedlings of hybrid genotypes (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*) called VR and C0. In the first assay, seedlings were treated with Acibenzolar-S-methyl (ASM), Agro-Mos, *Saccharomyces cerevisiae*, Dipel, Ecolife⁴⁰ and Crop-Set, five days before the inoculation with the pathogen. The severity of the disease was estimated 15 days after inoculation by comparison with a scale of notes. In the most effective treatments analyzed the activity of enzymes chitinase and peroxidase, 48 hours after inoculation (h.a.i). In the second assay seedlings were treated with ASM five days before

the inoculation and peroxidase and chitinase activity was determined 0, 24, 72 and 96 h.a.i. in leaves of different stages of development (1st, 2nd and 3rd pairs of leaves). In the third assay the action of ASM and *S. cerevisiae*, applied five days before the inoculation, was correlated with possible biochemical changes in plants. The chitinase, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and polyphenoloxidase activity in leaves of 1st and 2nd pairs collected in 5 periods 0, 24, 48, 72 and 96 h.a.i was determined. Finally, in the fourth test was analyzed the pattern of gene expression over time in seedlings of both genotypes after treatment with ASM and, after 5 days, inoculation with *P. psidii* in five periods (0, 24, 48, 72 and 96 h.a.i), through of macroarray technique. In the first assay it was found that the treatments ASM, *S. cerevisiae* and Ecolife were more efficient in controlling the rust. There was also an increase in activity of chitinase and peroxidase, in both genotypes, when treated with ASM and *S. cerevisiae*. In the second test results showed that the effect of ASM or the action of *P. psidii* contributed to changes of enzymes levels only in the development leaves (1st and 2nd pairs), with larger increases observed in VR plants 72 h.a.i., treated with ASM. The third test was found differences in chitinase, peroxidase and PAL activity in both clones, either by the action of the pathogen, the effect of inducers of resistance or by the interaction between pathogen-inducers. In the fourth assay, on plants of the VR genotype, several genes related to the strengthening of the cell wall, cell polarization, PR-proteins, enzymes involved in the route of phenylpropanoïdes and peroxidation of lipids, accumulation of phenolic compounds, among others, were differentially expressed in the plants were challenged by the pathogen, when only were treated with the resistance inducers or treated with inducer followed by inoculation. However, plants in the genotype C0 differential expression was only when the plants were treated with ASM.

Key-words: induction of resistance, mirtaceous rust, chitinase, PR-proteins, macroarrays

1 INTRODUÇÃO

A competitividade do Brasil frente aos demais países produtores de eucalipto deve-se ao clima tropical, somado a pesquisa na geração de tecnologias o que oferece ao agronegócio as seguintes vantagens: taxa de crescimento das espécies dez vezes maior que a do hemisfério norte; disponibilidade de áreas para plantios; domínio tecnológico; facilidade de acesso marítimo; gestão profissional e mão de obra qualificada para as indústrias, que podem e devem elevar seu aproveitamento tecnológico e produtivo, através da introdução da atividade nas diversas regiões brasileiras com aptidão a eucaliptocultura intensiva (Roxo, 2003).

Entretanto, como toda espécie cultivada em grandes áreas no Brasil, o eucalipto é suscetível a uma série de doenças desde a fase de viveiro até os plantios adultos. A doença, como fenômeno biológico, interfere nos processos fisiológicos da planta e determinam um mau desempenho de suas funções vitais. Esta interferência prejudicial provoca uma redução da eficiência fisiológica nas plantas, ocasionando danos que resultam em significativos impactos econômicos, de acordo com a espécie atacada e com a época do ano (Krugner,1995). Dentre essas, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter tem sido limitante ao estabelecimento de novos plantios e à condução por rebrota de materiais suscetíveis, após o corte raso. Além disso, esta doença tem ocorrido em mini-jardins clonais destinados à produção de brotos para miniestaquia e tem afetado a multiplicação clonal do eucalipto (Teixeira, 2004).

Devido à existência de variabilidade no grau de resistência tanto entre espécies de *Eucalyptus* quanto entre procedências de uma mesma espécie, a resistência

genética é apontada como a melhor opção para o controle da ferrugem do eucalipto. A resistência pode também ser ativada em plantas suscetíveis após a infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como 'indução de resistência' (Hammerschmidt & Dann 1997). O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes causais de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias (Sobrinho, 2004).

A planta ao ser invadida por um patógeno pode desencadear uma série de mecanismos de defesa na tentativa de conter o agente agressor. As plantas possuem fatores estruturais e bioquímicos pré-existentes (passivos, constitutivos) que estão envolvidos no processo de resistência antes da infecção pelo patógeno, tais como cutícula, tricomas, fibras e vasos condutores, fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos. Após a infecção, pode aumentar o nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça e tiloses (Pascholati & Leite, 1995).

Os conhecimentos gerados nas diferentes linhas de pesquisa dentro da área de fitopatologia poderão ser utilizados em programas de melhoramento genético, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes à doenças, garantindo assim, um incremento na produtividade destas culturas (Fernandes, 2005). Desta forma, estudos que visem à elucidação dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos no processo de defesa da planta contra o ataque de fitopatógenos devem ser priorizados, visando um maior entendimento destes processos e, consecutivamente, gerando conhecimentos que subsidiarão projetos biotecnológicos. Segundo Guzzo (2004) a identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA (DNA complementar) produzidas a partir de RNA mensageiros (mRNA) isolados de plantas inoculadas, tratadas com elicitores ou indutores de resistência, tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações hospedeiro-patógeno.

Para a elucidação dos mecanismos de defesa do eucalipto contra o fungo *Puccinia psidii* os objetivos do presente trabalho foi verificar o efeito de indutores de resistência bióticos e abióticos na redução da severidade da doença; comparar o metabolismo relacionado à defesa em folhas com diferentes níveis de desenvolvimento de plantas resistentes e suscetíveis à ferrugem, determinando a atividade de peroxidase e quitinase; avaliar o potencial dos indutores acibenzolar-S-metil e levedura *Saccharomyces cerevisiae* e correlacionar possíveis alterações bioquímicas no sistema de defesa da planta, dosada a partir da atividade das enzimas: quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase e com o auxílio da técnica de ‘macroarray’ verificar o padrão de expressão de ESTs (“expressed sequence tags”), provenientes de bibliotecas de cDNA construídas pelo projeto Genoma do Eucalyptus - FORESTs (EUCALYPTUS GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORCIUM), relacionadas ao sistema de defesa do eucalipto quando inoculados com *Puccinia psidii* ou quando tratados com indutor de resistência Acibenzolar-S-metil.

Para atingir esses objetivos a presente tese será dividida em cinco capítulos, sendo o primeiro capítulo intitulado “Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto” redigido em português conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica*; o segundo: “Atividade de quitinase e peroxidase em folhas de eucalipto com diferentes estágios de desenvolvimento após inoculação com *Puccinia psidii* e tratamento com Acibenzolar-S-metil (ASM)” redigido em português conforme as normas da Revista Fitopatologia Brasileira; o terceiro: “Efeito de Acibenzolar-S-metil (ASM) e *Saccharomyces cerevisiae* na ativação de defesas do eucalipto contra a ferrugem do eucalipto” que deverá ser redigido em inglês conforme as normas da revista *Phytopathology*; o quarto: “*Eucalyptus* ESTs involved in the mechanisms against plant pathogen and environmental stresses” redigido em inglês conforme as normas da revista *Summa Phytopathologica* e o quinto: “Expressão diferencial (“macroarray”) de genes relacionados ao metabolismo de defesa de eucalipto, quando inoculados com *Puccinia psidii* e tratados com Acibenzolar-S-metil” que deverá redigido em inglês conforme as normas da revista *Genetics and Molecular Biology*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui como centro de origem a Austrália e regiões próximas como Timor, Indonésia, Papua Nova Guiné, Molucas, Irian Jaya e sul das Filipinas, em uma faixa compreendida entre latitudes 9° N e 44° S (Eldridge et al., 1993). Apresenta uma ampla plasticidade e dispersão mundial, crescendo satisfatoriamente em diferentes situações edafoclimáticas, extrapolando àquelas das regiões de origem (Santos et al., 2001). O nome eucalipto deriva do grego: eu (= bem) e kalipto (= cobrir), referindo-se à estrutura globular arredondada de seu fruto, caracterizando o opérculo que protege bem as suas sementes. Existem cerca de 500 a 700 espécies de eucalipto descritas, além de muitas subespécies e alguns híbridos naturais (Bertolucci et al., 1995).

Pryor & Johnson (1971), dividiram o gênero *Eucalyptus* em 7 subgêneros (*Corymbia*, *Blakella*, *Eudesmia*, *Ganbaea*, *Idiogenes*, *Monocalyptus* e *Symphyomyrtus*). Um oitavo subgênero, *Telocalyptus*, foi mais tarde sugerido por Johnson (1976). Recentemente, os subgêneros *Corymbia* e *Blakella*, foram formalmente separados do restante dos *Eucalyptus* em um novo gênero denominado *Corymbia* (Hill & Johnson, 1995). O panorama mais recente sobre filogenia do *Eucalyptus*, o qual consistiu basicamente de análises de caracteres morfológicos e moleculares, relata duas grandes linhagens, uma compreendendo o gênero *Angophora* e *Corymbia* e outra compreendendo todos os subgêneros de *Eucalyptus*

(Hill & Johnson, 1995; Araújo et al., 2002). O sub-gênero *Symphomyrtus* é o grupo que apresenta a maior parte das espécies cultivadas no mundo e apresenta nove seções, das quais três contém praticamente todas as espécies mais cultivadas como exóticas: Seção *Transversaria* (*E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*); Seção *Exsertaria* (*E. camaldulensis*, *E. exserta*, *E. tereticornis*); Seção *Maidenaria* (*E. globulus*, *E. viminalis*). Assim, o eucalipto compreende todas as plantas do gênero *Eucalyptus*, com 500 espécies descritas, além de muitas subespécies e alguns híbridos naturais (Brooker & Kleining, 1990).

O eucalipto possui flores morfológicamente bissexuadas (hermafroditas), apresenta ampla faixa de padrões de cruzamento, desde autofecundação causada por cleistogamia, até fecundação cruzada obrigatória, devido à autoincompatibilidade, macho esterilidade ou esterilidade feminina (Pryor, 1957, Davis, 1969, Carr et al., 1971, citados por González, 2002). Nas populações naturais, as espécies cultivadas de eucalipto exibem um sistema de cruzamento misto, mas predominantemente alógamo. Análises de isoenzimas de sementes de uma série de espécies resultaram em uma taxa de alogamia estimada, (t) da ordem de 0,75 (Moran & Bell, 1983).

Segundo Eldridge et al. (1994) das 108 espécies do gênero *Eucalyptus*, 95 espécies apresentam número básico de cromossomos $2n=22$ da mesma forma que a maioria dos gêneros da família Myrtaceae. As demais 13 espécies apresentam $2n=24$, sendo que, entre estas, somente *E. cladocalyx* é plantada com finalidade de produção de madeira (Eldridge et al., 1994). Os cromossomos neste gênero são extremamente pequenos o que dificulta uma contagem acurada (Ruggeri, 1961) e não há repetições que possam confirmar valores de $2n=24$. Estimativas do conteúdo de DNA nuclear para as espécies examinadas por Grattapaglia & Bradshaw (1994) variaram entre 0,77 pg para *E. citriodora* e 1,47 pg para *E. saligna*, o que corresponde a um genoma haplóide de 370- 700 mega pares de bases.

2.2 Histórico e importância econômica da cultura do eucalipto

Historiadores mencionam que, por volta de 1774, o eucalipto foi introduzido na Europa por Antônio Guichenot e, em 1788, foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L'Héritier de Brutelle, no Sertum Anglicum, em Paris, valendo-se do material recolhido em expedições no território australiano. Até a metade do século XIX o

eucalipto figurou apenas em coleções de alguns jardins botânicos, sem nenhuma importância comercial. Na Índia, os primeiros plantios ocorreram em 1843 e, por volta de 1856, já havia plantações de eucaliptos bem desenvolvidas. Na África do Sul, os primeiros ensaios com eucaliptos ocorrem em 1828, na colônia do Cabo. Os primeiros ensaios na Europa, visando à produção comercial, datam de 1854, principalmente com o *E. globulus*, plantados em Portugal pelo Barão de Massarellos e por J. M. Eugênio de Almeida. Em 1863 foi introduzido na Espanha e, em 1869 na Itália (O eucalipto, 2001).

Na América do Sul, talvez o Chile tenha sido o primeiro país a introduzir o eucalipto em 1823, recebendo as sementes de um navio inglês. A Argentina teria introduzido o eucalipto em seu país em 1865, através do Presidente Garcia Moreno. No Uruguai, as primeiras sementes de eucalipto foram recebidas em 1853. É difícil se determinar, com segurança, a data de introdução do eucalipto no Brasil. Acredita-se que os exemplares mais antigos encontrados no país são de *E. robusta* e *E. tereticornis*, plantados pelo Imperador D. Pedro I no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em 1825 (O eucalipto, 2001). No Rio Grande do Sul, as primeiras mudas foram plantadas em 1868, por Frederico de Albuquerque (Ferreira; Santos, 1997) e, no mesmo ano, também foram plantados alguns exemplares na Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro. Até o princípio do século XX, o eucalipto foi plantado para fins ornamentais, e também para uso como quebra-vento. Com o objetivo de realizar pesquisas, o eucalipto foi introduzido sistematicamente no Brasil em 1903, por Edmundo Navarro de Andrade que trabalhava na Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Ele iniciou o cultivo e o estudo de espécies de eucalipto visando utilizar a madeira para alimentar as caldeiras das locomotivas, produzir moirões para ferrovias e postes para eletrificação. Navarro de Andrade introduziu um número extraordinário de espécies no Horto Florestal de Rio Claro, constituindo um dos mais completos bancos de germoplasma do país (Andrade, 1961; Lima, 1993).

Estimativas da área global reflorestada com eucalipto apontam para 18 milhões de ha (FAO, 2000). Há grandes áreas de plantio na Ásia tropical, concentradas principalmente na Índia, com cerca de 8 milhões de ha, como também na América do Sul, com aproximadamente 10 milhões de ha. A estatística é dominada pelo Brasil, onde há aproximadamente 3,4 milhões de ha reflorestados com eucalipto (SBS, 2005). Além disso, plantios expressivos são encontrados em países de clima temperado, incluindo China, Chile,

África do Sul, Portugal e Espanha. Atualmente, as dez espécies de eucalipto mais importantes nas plantações florestais no mundo, em termos de incremento médio anual de madeira, são: *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. citriodora*, *E. robust*, e *E. paniculata*.

No Brasil, o eucalipto tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais, por diversas razões: pela grande plasticidade do gênero, devido à diversidade de espécies adaptadas a diferentes condições de clima e solo; pela elevada produção de sementes e facilidade de propagação vegetativa; pelas características silviculturais desejáveis, como rápido crescimento, produtividade e boa forma do fuste; em função do melhoramento genético e ao manejo e pela adequação aos mais diferentes usos industriais, com ampla aceitação no mercado (Mora & Garcia, 2000; Silva, 2005).

O sucesso do eucalipto no país foi catalisado por programas de incentivos fiscais estabelecidos pelo governo federal durante as décadas de sessenta e setenta do século passado. Estima-se que dos 2,9 milhões de ha de reflorestamentos com eucalipto implementados pelos programas de incentivos, 2,3 milhões de ha transformaram-se em florestas de produção para o abastecimento de importantes segmentos consumidores (Iuseum et al., 1988; Brazett, 1993).

As espécies mais plantadas no Brasil são: *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. dunnii* (BRACELPA, 2004). Entre outras espécies, destacam-se o *E. cloeziana* e o *E. citriodora*. No entanto, da área total plantada com eucalipto no Brasil aproximadamente 50% é ocupada por algum tipo de híbrido (BRACELPA, 2004). As espécies mais representativas podem classificar-se segundo a sua utilidade: para lenha e carvão: *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. torelliana*, por exemplo, oferecem grande quantidade de lenha em curto prazo; para a produção de papel e celulose: *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla* são as mais apropriadas por apresentarem cerne branco e macio; para postes, moirões, dormentes e estacas: *E. citriodora*, *E. robusta*, *E. globulus* são as mais apropriadas por apresentarem cerne duro e por resistir ao tempo; para serrarias: *E. dunnii*, *E. viminalis*, *E. grandis* se apresentam como as mais adequadas porque são espécies de madeira firme e não apresentam rachaduras (Ambiente Brasil, 2005).

E. urophylla e *E. grandis* são espécies de maior interesse para a eucaliptocultura no Brasil. Sendo utilizados para a fabricação de celulose, chapas duras,

produção de carvão e outros fins. O *E. urophylla* possui uma ampla capacidade de adaptação a diversas condições de ambientes tropicais, aliada à tolerância ao patógeno *Cyphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto (Santos et al., 1990). Já, o *E. grandis* está adaptado ao clima quente e úmido das regiões sudeste e nordeste da Austrália. A sua madeira é utilizada principalmente para produção de polpa (Muro-abad, 2001). Estas duas espécies foram utilizadas para a constituição de híbridos interespecíficos (“Urograndis”) possibilitando a união das características mais desejáveis de ambas às espécies, tais como: boa produtividade, adaptação ecológica e resistência ao cancro. Assim, este híbrido passou a ser o mais cultivado no território nacional (BRACELPA, 2004; Bertolucci et al., 1995). Considerando-se as espécies do gênero, *E. grandis* é a espécie majoritariamente plantada no Brasil. Pode alcançar produções de 50-60 m³ por hectare por ano em condições favoráveis. O *E. grandis* tem uma idade de colheita menor, dependendo do uso final da madeira. Para produção de polpa e celulose o tempo de colheita é de 5-6 anos. Já para postes de telefone a idade de colheita varia entre 7 e 8 anos e para uso como combustível industrial entre 10 e 12 anos (FAO, 2005).

O eucalipto é cultivado para os mais diversos fins, tais como, papel, celulose, lenha, carvão, aglomerado, serraria, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, ornamentação e quebra-vento. De acordo com um anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de florestas plantas de 2008 a área com eucalipto das suas associadas, por segmento industrial, em 2007 foi 72% para indústria de papel e celulose, 22% para siderurgia e 5% para painéis reconstituídos.

A área de florestas plantadas com eucalipto no Brasil em 2007 foi de 3.751.867 ha representando um crescimento de 202.719 ha em relação ao ano de 2006. Desse total, o estado de Minas Gerais contribui com 1.105.961 ha, seguindo do estado de São Paulo com 813.372 ha e o estado da Bahia com 550.127 ha (ABRAF, 2008). O sistema agroindustrial florestal, no segmento de florestas plantadas (primário e processamento industrial) em 2007 gerou aproximadamente 4,6 milhões de empregos incluindo diretos (656 mil) indiretos (1,8 milhões) e empregos resultantes do efeito-renda (2,1 milhões).

A hibridação interespecífica tornou-se a forma mais rápida e eficiente de obtenção de ganhos genéticos no melhoramento de espécies de *Eucalyptus*, com reflexos diretos e significativos na indústria de base florestal, uma vez que, a grande diversidade interespecífica deste gênero facilita a busca de combinações desejáveis nos programas de

melhoramento. A busca de complementaridade nas características tecnológicas da madeira, a tolerância a estresses bióticos e abióticos, bem como a manifestação da heterose, foi verificada em vários cruzamentos híbridos, como por exemplo, o híbrido interespecífico *E. urograndis* (*E. grandis* x *E. urophylla*) (Assis & Mafia, 2007).

O emprego da clonagem em vez dos métodos sexuais de produção de mudas, permitiu a transferência da variância genética total, resultando na obtenção de ganhos máximos, sejam de produtividade volumétrica, sejam relacionados a propriedades tecnológicas da madeira ou resistência a fatores bióticos e abióticos. A clonagem possibilitou ainda, a produção de matéria-prima mais uniforme que, do ponto de vista industrial, representa significativos benefícios tanto na maximização dos custos do processo industrial, quanto na qualidade dos produtos. Dessa forma, técnicas de clonagem por micropropagação, como a microestaquia e a miniestaquia, ganharam destaque e, milhares de árvores são selecionadas nas populações existentes e propagadas vegetativamente, para serem incluídas nos jardins clonais, testes clonais e plantios comerciais clonais (Oda et al., 2007).

Entretanto, como cultura inserida no Brasil, o eucalipto é suscetível à uma série de doenças, na sua maioria, provocada por fungos patogênicos desde a fase de viveiro até os plantios adultos. A doença, como fenômeno biológico, interfere nos processos fisiológicos da planta, devido a elementos bióticos ou abióticos que determinam um desempenho anormal de suas funções vitais. Esta interferência prejudicial provoca uma redução da eficiência fisiológica nas plantas causando significativos impactos econômicos, de acordo com a espécie atacada e da época do ano (Krugner, 1995).

2.3 A ferrugem do eucalipto

O agente causal da ferrugem do eucalipto *Puccinia psidii* Winter, apresenta uma distribuição geográfica ampla. Apesar de ser um fungo nativo da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído nas Américas do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Equador, Paraguai, Uruguai e Venezuela) e Central e nas ilhas do Caribe, havendo ainda relatos da sua presença na Flórida (Alfenas et al., 2004). Ainda não existem evidências do *P. psidii* na Austrália, centro de origem do *Eucalyptus* (Coutinho et al., 1998). Ataca espécies da família Myrtaceae, incluindo o eucalipto, jambeiro, goiabeira, jabuticabeira, araçazeiro,

pitangueira e jamelãozeiro, respondendo de maneira diferente em cada hospedeiro quanto à agressividade (Alfenas et al., 2004; Tommerup et al., 2004). Esse patógeno é altamente infectivo em algumas espécies economicamente importantes como goiaba e pimentão (Coutinho et al., 1998) e várias espécies de *Eucalyptus* são hospedeiras do fungo, entre elas *E. citriodora*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. obliqua*, *E. pilularis* e *E. saligna* (Krugner et al., 1997).

As doenças fúngicas causadas por basidiomicetos pertencentes à Ordem Uredinales são denominadas ferrugem. Tais microorganismos são ditos, atualmente, parasitos ecologicamente obrigatórios, uma vez que algumas poucas espécies puderam ser mantidas em laboratório, graças ao desenvolvimento de culturas axênicas (Martins et al., 1995). Os fungos representantes da Ordem Uredinales apresentam alta especificidade em relação a seus hospedeiros, sendo capazes de infectar um grande número de plantas vasculares, cultivadas e silvestres (Aparecido & Figueiredo, 1999). Pertencentes a ordem Uredinales foram relatados aproximadamente 130 gêneros e 5000 espécies que afetam plantas, representando assim um dos maiores grupos de fungos fitopatogênicos. Atacam muitas espécies economicamente importantes como mirtáceas, leguminosas, cereais, cafeeiro, etc (Kaiserslautern, 2005).

Os fungos causadores de ferrugem são patógenos biotróficos requerem a maquinaria celular do hospedeiro para poder alimentar-se e reproduzir-se. As hifas especializadas destes, chamadas de haustórios, podem realizar interações estáveis com os hospedeiros, que podem durar até meses. O propósito deste patógeno é realizar uma infecção estável e causar um dano mínimo no seu hospedeiro (Mendgen & Hahn, 2002). Depois da germinação dos uredósporos da ferrugem sobre a superfície foliar, a hifa penetra dentro da planta pelas aberturas estomatais. Uma vez dentro do hospedeiro, um micélio intercelular prolifera e produz o que se denomina haustório dentro das células da planta tem uma função fundamental na absorção de nutrientes, nos tecidos vegetais. (Kaiserslautern, 2005). O mecanismo envolvido no processo de absorção de nutrientes dentro do haustório está relacionado a um transporte do tipo “simport”, que utiliza o potencial de gradiente dos prótons. O gradiente protônico é produzido pela atividade de uma ATPase protônica de membrana (Kaiserslautern, 2005).

A disseminação do patógeno se dá pela ação dos ventos, das chuvas,

insetos e pássaros, no entanto condições abióticas favoráveis são necessárias, como temperaturas amenas e umidade relativa bastante elevada (Ruiz et al., 1989). Essas condições são importantes para o desenvolvimento da doença porque atuam sobre o patógeno, possibilitando a propagação e germinação de suas estruturas infectivas. Na ausência de condições favoráveis, ocorre a formação de estruturas denominadas teliósporos, que possibilitam a sobrevivência do patógeno (Figueiredo & Carvalho Jr., 1994, 1995). Como resultado dessas estratégias de sobrevivência, a infecção primária pode ocorrer assim que as condições tornam-se favoráveis, devido à liberação dos basidiósporos infectivos produzidos em decorrência da germinação dos teliósporos, dando continuidade à disseminação da doença (Ferreira, 1983).

No país a doença constitui um sério problema principalmente devido à ocorrência de condições ambientais favoráveis praticamente durante todo o ano. Desde 1973 perdas econômicas preocupantes, de até 100%, tem sido registradas sobre espécies do gênero *Eucalyptus* (Aparecido et al., 2003). A formação de orvalho é um dos fatores determinantes de novas infecções e produção de novos urediniósporos de *P. psidii*. Ferreira (1983) relata que períodos de duas a três semanas com dias de temperatura relativamente baixas e alta umidade podem favorecer a ocorrência de surtos da ferrugem. Uma das características da ferrugem do eucalipto é manifestar-se na forma de surtos esporádicos de curta ou, relativamente, longa duração (um mês até mais de seis meses). Os surtos de longa duração incluem ciclos secundários ou repetidos de infecções urediniospóricas (Ferreira, 1989).

Na presença de água livre, no escuro, e a temperaturas entre 15 e 25 °C, ocorre a germinação dos uredosporos na superfície do hospedeiro. Essas condições ambientais ideais prevalecem no Brasil de maio a agosto, e os maiores níveis de ferrugem em eucalipto foram registradas nesse período. No entanto, períodos favoráveis à infecção podem variar de ano para ano e de acordo com a região geográfica (Coutinho et al., 1998). A penetração direta do patógeno ocorre em folhas jovens de genótipos resistentes e suscetíveis dentro de 24 horas após a inoculação.

No Brasil a ferrugem do eucalipto foi relatada pela primeira vez em 1929 e formalmente descrita em 1944 (Joffily, 1944 citado por Souza, 2008). A doença permaneceu sem destaque por um longo período de tempo, embora não esquecida. No entanto, com a ampliação da área de incidência da enfermidade os surtos tornaram-se cada vez mais

freqüentes. A primeira constatação de que se tem notícia, acarretando danos preocupantes, é de 1973 em viveiros e em plantações com menos de 18 meses de idade, em *E. grandis* - procedência África do Sul - no Espírito Santo (Ferreira, 1983). Desde então, ataques esporádicos, porém severos, de ferrugem do eucalipto ocorreram em viveiros e em plantações de eucaliptos nas regiões do Vale do Rio Doce, Zona da Mata e Açucena, em Minas Gerais, No Espírito Santo e no Sul da Bahia (Moraes et al., 1982; Castro, 1983). Levantamentos efetuados em plantios seminais de *E. grandis* nas regiões do Vale do Paraíba e sul do Estado de São Paulo revelaram que 35% das árvores apresentavam ferrugem (*P. psidii*) aos 6 meses de idade. As plantas altamente infectadas tiveram reduções de 25 a 35% em altura e diâmetro quando comparada com as sadias (Silveira et al., 2003).

Este fungo produz uma doença que afeta plantas jovens, viveiros e jardins clonais. A ferrugem do eucalipto só ataca plantas jovens com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros como primórdios foliares, terminais de galhos e haste principal (Figueredo, 2001). Os sintomas do ataque são pequenas pontuações na parte inferior das folhas, levemente salientes de coloração verde clara ou vermelho-amarelada. Após duas semanas as pontuações se transformam em pústulas de uredósporos amarelos. As pústulas aumentam de tamanho e em seguida ocorre a típica esporulação uredospórica de coloração amarela forte, nos órgãos atacados, que ficam tomados pela infecção (Rayachhetry et al., 2001). Estas pústulas podem coalescer, recobrando a superfície das brotações do eucalipto quando o ataque é intenso. Em consequência, os tecidos afetados morrem e se secam, adquirindo coloração negra, como se fossem queimados. Dependendo das condições ambientais a planta pode reagir emitindo novas brotações. Com o desenvolvimento das folhas e do caule, a massa amarela de esporos desaparece dando lugar a lesões salientes, rugosas, de coloração marrom (Santos et al., 2001).

Nas folhas as lesões aparecem dispersas em ambas as faces da folha e às vezes sobre a nervura principal. São comumente delimitadas por halo escuro e arroxeado. Nos ramos a característica verrugosa das lesões se torna bastante típica. Como o ataque se dá antes das folhas completarem o seu desenvolvimento, estas freqüentemente acabam ficando deformadas (Santos et al., 2001). Plantas altamente suscetíveis podem ter seu desenvolvimento comprometido pela doença, sofrendo um enfezamento quando severamente atacadas. Estas plantas poderão ser dominadas pelas adjacentes, que, menos afetadas ou sadias, continuam

crescendo normalmente. Deste modo, a ferrugem do eucalipto deixou de ser uma doença cujos danos eram consideráveis apenas em raras ocasiões (Krugner, 1980).

O controle da ferrugem de acordo com Santos (2001), em condições de campo, não justifica os gastos com aplicações de fungicidas em função das perdas verificadas, as melhores práticas envolvem estratégias de escape, evitando-se áreas propícias à ocorrência da doença ou evitando-se o plantio de materiais suscetíveis nessa região. No caso de ataque intenso no viveiro, o controle químico com fungicidas pode ser eficiente.

A resistência genética é apontada como a melhor opção para o controle da ferrugem do eucalipto, devido à existência de variabilidade no grau de resistência, tanto entre espécies de *Eucalyptus*, quanto entre procedências de uma mesma espécie (Krugner, 1997). No entanto, a forma de colonização de *P. psidii* (parasita obrigatório), juntamente com a ocorrência do patógeno em uma grande extensão territorial e em uma ampla gama de espécies hospedeiras, permitem supor a existência de raças do patógeno e colocam em risco a durabilidade da resistência. Essa suposição é reforçada por vários estudos de inoculações cruzadas demonstrando uma considerável variabilidade fisiológica dentro de *P. psidii* (Castro et al., 1983; Ferreira, 1989; Coelho et al., 2001).

Em inoculações cruzadas de *E. grandis* e *E. cloeziana*, goiabeira e jambeiro com *P. psidii* foi verificado que as quatro espécies apresentaram-se como hospedeiras de *P. psidii* proveniente de eucalipto, no entanto, mostraram respostas diferentes quanto à intensidade da infecção (Castro et al., 1983). A variabilidade fisiológica de *P. psidii* também foi testada por Coelho et al. (2001) em goiabeira, jambeiro e *E. grandis*, utilizando-se 13 isolados do patógeno. Neste trabalho, os autores detectaram três grupos de especialização fisiológica, sendo o grupo 1 compatível com eucalipto e jambeiro, grupo 2 com eucalipto e goiabeira e o grupo 3 apenas com goiabeira. Furtado et al. (2005) também verificaram a existência de especializações fisiológicas em diferentes populações do patógeno testados em *E. grandis* e no híbrido 'Urograndis'. Neste trabalho, foi observada virulência de vários isolados para *E. grandis*, sendo que dois isolados induziram reação de hipersensibilidade; já o híbrido mostrou-se mais resistente que o *E. grandis*.

A resistência genética para a ferrugem do eucalipto pode ser explorada, pela presença de grande variabilidade dos indivíduos, observada nas plantações. O desenvolvimento de um programa de melhoramento genético, através de seleção, é uma

alternativa recomendável para o controle da ferrugem. É possível selecionar espécies, procedências, progênies ou clones de *Eucalyptus* resistentes para plantios comerciais ou para serem usados nos programas de melhoramento genético, a partir de infecções naturais no campo, em áreas onde a enfermidade é severa, ou preferencialmente por meio de inoculações artificiais do patógeno em mudas, sob condições controladas (Carvalho, 1991).

Dianese et al. (1984) ao avaliarem 13 espécies de *Eucalyptus*, provenientes de localidades diferentes, onde a população foi cultivada, selecionada e adaptada, em relação a sua resistência à infecção por *P. psidii*, concluíram que a suscetibilidade à doença estava relacionada à espécie em questão assim como à sua procedência. De Carvalho et al. (1998) avaliaram o padrão de resistência de diferentes progênies das espécies *E. cloeziana*, *E. citridora*, *E. urophylla* e *E. pellita* distribuídas em distintas procedências e detectaram variação dos níveis de resistências tanto entre procedências e progênies da mesma espécie, assim como entre espécies diferentes. Os autores identificaram como altamente resistentes todas as progênies de *E. citridora*, *E. urophylla* e *E. pellita*, independente da procedência e uma progênie de *E. cloeziana*, Ibitira X-28 arv. 4 procedente de Quadon-Austrália. As demais progênies de Quadon-Australia de *E. cloeziana* dividiam-se em resistentes e suscetíveis. Ibitira Z-28 arv. 7 e Ibitira X-33 arv. 2 apresentaram-se como resistentes e Ibitira X-29 arv.10 como suscetível. As outras progênies de *E. cloeziana* apresentaram-se como suscetíveis.

2.4 Interação planta–patógeno

Fitopatógenos necessitam de seus respectivos hospedeiros para ter a sobrevivência garantida. Nesse sentido a maioria dos patógenos retira seus nutrientes do hospedeiro e utilizam no seu próprio metabolismo para desempenhar atividades vegetativas e reprodutivas. Entretanto, muitos desses nutrientes encontram-se no interior do protoplasma das células vegetais e, para ter acesso aos mesmos, o patógeno necessita vencer as barreiras físicas ou químicas do hospedeiro, bem como promover a colonização interna dos tecidos a partir do sítio de infecção. Normalmente essa infecção se caracteriza pela desagregação celular e pela utilização de nutrientes. Dessa maneira, para um patógeno infectar uma planta, é necessário que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes

necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta. Para isso, utiliza-se de substâncias tais como: enzimas, toxinas e hormônios (Pascholati 1995).

Para que os patógenos de plantas consigam infectá-las, primeiro precisam de sinais das plantas para induzir diferenciação e expressão de genes essenciais para a patogenicidade. Isto se torna um passo essencial para a ferrugem, uma vez que a diferenciação das hifas é ativada pela topografia da superfície das células da planta (Thordal-Christensen, 2003).

O sucesso dos patógenos em atravessar a primeira barreira de defesa depende do grau de co-evolução da relação patógeno-hospedeiro (Thordal-Christensen, 2003). Os patógenos podem atravessar estas defesas de duas maneiras: pelas aberturas estomáticas presentes no caule e folhas ou mediante estruturas de penetração, tal o caso de fungos, que introduzem uma hifa especializada em perfuração através das epidermes (Holt et al., 2003).

De acordo com Mendgen et al. (1996), os eventos iniciais da infecção ocorrem através da adesão do patógeno na cutícula e o crescimento direto de tubos germinativos na superfície das plantas. A penetração de urediniósporos, na maioria das vezes, é direta, através da cutícula e epiderme, entre as paredes anticlinais das células epidérmicas, mediante a formação de apressório. Após a penetração tem início o processo de colonização intercelular dos tecidos do hospedeiro pelo patógeno, que por meio de haustórios intracelulares retira os nutrientes no interior das células do hospedeiro (Ferreira, 1989; Bedendo, 1995; Alfenas et al., 2004).

Os fitopatógenos podem utilizar enzimas para degradar a parede celular vegetal. Estas enzimas, denominadas de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, compreendem pectinases, cutinases, celulases, xilanases e proteases. Essas podem apresentar ação tanto sinérgica como seqüencial na degradação dos substratos. A parede celular das plantas superiores é constituída de até 90 % de carboidratos e 10 % de proteínas. Apresentam celulose, hemiceluloses, substâncias pécticas, proteínas e lignina. Entretanto, a proporção e a distribuição destes componentes é variável de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (Wulff, 2002).

Diversos fungos fitopatogênicos produzem cutinases (enzimas degradadoras da cutina) durante o processo de infecção, auxiliando a penetração do mesmo

nos tecidos do hospedeiro, bem como a adesão dos esporos. A atividade das cutinases, como auxiliares na adesão de esporos na cutícula, tem sido demonstrada em uredósporos de ferrugens (Deising et al., 1992, citado por Mendgen et al., 1996). Pascholati (1995) também descreveu a importância dessas enzimas, para os fungos que penetram através da superfície intacta da planta, na degradação enzimática dessa barreira, constituindo em fator chave na patogenicidade.

A planta, ao ser invadida por um patógeno, pode desencadear uma série de mecanismos de defesa na tentativa de conter o agente agressor. As plantas possuem fatores estruturais e bioquímicos pré-existentes (passivos, constitutivos) que estão envolvidos no processo de resistência antes da infecção pelo patógeno como cutícula, tricomas, estômatos, fibras e vasos condutores, fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos. Após a infecção, pode aumentar o nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça e tiloses (Pascholati & Leite, 1995).

A primeira linha de defesa de uma planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência do patógeno, que utiliza seus artifícios para penetrar na mesma e causar a infecção (Agrios, 2005). A forma física da cutícula, o número, a morfologia e o período de abertura de estômatos e a presença de tricomas por área de epiderme são fatores importantes na definição do nível de resistência a patógenos por algumas espécies vegetais (Medeiros et al, 2003; Agrios, 2005). A composição química, a quantidade e a forma física das ceras epicuticulares de folhas são governadas por muitos fatores, variando entre espécies (Baker & Hunt, 1981). Dessa forma, a consideração da cutícula como estrutura de resistência deve ser analisada com prudência, visto que tal capacidade depende das características desta e do agente de inter-relação (Silva et al, 2005).

Segundo Souza (2008), em estudo da patogênese de *P. psidii* pela micromorfologia da epiderme foliar de clones de eucalipto, verificou a presença de ceras epicuticulares compostas por placas, em clones resistentes e suscetíveis a ferrugem em diferentes estágios foliares. Observou-se que nos locais de penetração do patógeno há menor ocorrência de ceras, podendo-se sugerir uma possível capacidade do patógeno em degradar

esses componentes; evidenciando uma correlação direta entre presença de cera nos diferentes clones e diferentes estágios foliares com a penetração e infecção pelo fungo.

Além da cutícula, o número e distribuição dos estômatos também atuam no desenvolvimento do patógeno. No entanto, para patógenos que penetram nos tecidos do hospedeiro por via direta, como *P. psidii*, estes fatores não têm influência no desenvolvimento da doença ou seja, a penetração do tubo germinativo dos esporos é realizada diretamente, dispensando a existência de aberturas naturais ou ferimentos (Ferreira, 1989).

A lignificação das paredes celulares também pode contribuir na restrição à colonização das plantas por fitopatógenos. Assim, paredes mais espessadas podem se tornar mais resistentes à ação de enzimas degradadoras e à difusão de toxinas provenientes dos patógenos (Pascholati e Leite, 1995; Agrios, 2005; Silva et al., 2005). Além disso, a parede celular também pode inibir o crescimento do patógeno através de enzimas degradadoras da parede fúngica e da produção de fitoalexinas, produtos naturais acumulados após a infecção (Pascholati & Leite, 1995; Agrios, 2005).

De acordo com Pascholati e Leite (1995), o xilema e as fibras esclerenquimáticas, presentes na região da nervura central da folha, são ricos em lignina, podendo interromper o avanço de fungos e bactérias nessa região. Este fator pode estar relacionado à preferência de alguns patógenos, como o *P. psidii*, pela região internervural da folha, que apresenta lignina somente nas regiões dos feixes vasculares, sendo o restante do mesofilo destituído de lignificação.

Segundo Salvatierra (2006), a polarização celular, temporalmente prévia à resposta hipersensível, é uma resposta que envolve uma série de mudanças morfológicas e uma rápida reprogramação metabólica da planta frente a fungos biotróficos. Esta apresenta um citoesqueleto metabolicamente muito ativo, um deslocamento do núcleo até o sítio da infecção através dos filamentos e microfilamentos do citoesqueleto, na procura de uma resposta rápida e localizada (Gross et al., 1993) e a construção de uma barreira neste sítio reforçando a parede celular. Antes ainda da penetração fúngica detectam-se correntes citoplasmáticas indicando o início da resposta, correlacionada a uma reorganização profunda do citoesqueleto que são os componentes mais importantes (Schlüter et al., 1997).

Além dessas barreiras estruturais da planta, utilizadas na contenção do patógeno, há também barreiras químicas, resultantes do metabolismo secundário do vegetal.

Entre os mecanismos de resistência bioquímicos pré- formados, destaca-se a ocorrência de glicosídeos cianogênicos e fenólicos, fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, fototoxinas, quitinases e β - 1,3 glucanases. Por outro lado, compostos como as fitoalexinas, e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), que também fazem parte do arsenal de mecanismos de defesa, são formados após a infecção do tecido da planta (Pascholati & Leite, 1994).

Acredita-se que as barreiras formadas têm a função de aprisionar ou excluir o patógeno do acesso aos nutrientes, determinando um engrossamento considerável da parede celular (Schmelzer, 2002). Este engrossamento da parede celular chamado de papila é um fenômeno citológico conhecido (Aist, 1976) que apresenta características como: calose, aumento no conteúdo de lignina, celulose, pectina, quitina, glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas, peroxidases e lipídeos entre outros (Schmelzer, 2002). A formação da papila é um processo altamente coordenado de síntese de compostos estruturais, transporte, secreção e reforço da parede altamente localizado e parece estar relacionado à resistência à infecção fúngica (Schmelzer, 2002).

Uma reação de hipersensibilidade pode ser manifestada como uma morte celular programada, rápida e localizada no local da infecção, eliminando o organismo agressor (Dangl, 1998; Lam et al., 2001). Os produtos da expressão gênica de genes Avr e R interagem diretamente ou indiretamente, produzindo uma resposta altamente específica. Nos primeiros 15 minutos se engatilha uma resposta que envolve fluxos iônicos através da membrana plasmática, produção de compostos reativos de oxigênio e óxido nítrico e uma reprogramação da expressão gênica por meio da ação de fatores de transcrição e quinases. Após este primeiro quarto de hora se produz a síntese de ácido salicílico e etileno, fortalecimento da parede celular, processos de lignificação, síntese de compostos antimicrobianos, como por exemplo as fitoalexinas, culminando na morte celular programada, que caracteriza este tipo de resposta (Dangl & Jones, 2001).

Em relação aos compostos fenólicos, apesar de serem sintetizados por rotas metabólicas secundárias de plantas, sua importância é fundamental para o metabolismo vegetal (Strack, 1997). Nem todos os fenóis têm função conhecida, sendo que alguns deles parecem ser simples intermediários do metabolismo normal das plantas (Beckman, 2000). Os fenóis são produzidos em células especializadas distribuídas pelos tecidos, ao acaso ou em

locais estratégicos. As enzimas dessa síntese são associadas ao retículo endoplasmático, o que permite que, logo após a produção, esses compostos sejam armazenados em vesículas, na sua forma original ou glicosilada. A compartimentalização é fundamental para o funcionamento das células, pois os fenóis são tóxicos e devem ser mantidos na sua forma reduzida. A descompartimentalização de fenóis pode levar à sua rápida oxidação, pela ação de peroxidases, em resposta a infecção. Fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica tanto sobre patógenos como sobre a própria célula vegetal e contribuir para a reação de hipersensibilidade (Hrazdina, 1994; Isaac, 1992).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) possivelmente é a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal, pois está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e secundário e a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2004). A FAL está localizada nos cloroplastos das células vegetais, principalmente nas membranas dos tilacóides e atua na desaminação da L-fenilalanina, formando ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser transformado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico), os quais estão presentes na formação de ésteres, cumarinas, flavonóides e ligninas (Cavalcanti et al., 2005).

Em muitas espécies de plantas, a resposta à infecção por bactérias, vírus e fungos patogênicos ou a vários estresses abióticos é acompanhada pela síntese de uma variedade de proteínas, muitas delas chamadas proteínas-RP ou "proteínas relacionadas à patogênese". Essas proteínas foram primeiramente descritas por Van Loon & Van Kammen (1970) citados por Guzzo (2004), em folhas de fumo, após a infecção pelo vírus do mosaico (tobacco mosaic virus-TMV). As proteínas-RP não eram detectadas em folhas saudáveis, mas tinham sua atividade induzida em folhas inoculadas com o vírus (Liu et al., 1995). Estão localizadas no espaço intercelular, no vacúolo e/ou parede da célula vegetal, tendo sido encontradas em várias espécies de plantas pertencentes a diferentes famílias. A maioria possui um peptídeo-sinal na região N-terminal, responsável por sua translocação através da membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intercelular (Bol et al., 1990), citados por Guzzo (2004).

Essas proteínas apresentam algumas características que as distinguem das demais proteínas vegetais, tais como estabilidade em pH baixos, em torno de 2,8 (quase a

totalidade das demais proteínas das plantas precipita nessa condição), resistência à ação de enzimas proteolíticas, estabilidade sob altas temperaturas (em torno de 60-70 °C), com massa molecular variando entre 8 e 50 kDa e podem estar localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto (Stintzi et al., 1993 citado por Beltrame, 2005).

Há dois mecanismos de ação das proteínas-RP. O primeiro mecanismo é hidrolítico sobre a parede celular de fungos e bactérias (Yoshikawa; 1993), como as quitinases e glucanases que hidrolisam polímeros de quitina e de glucana, respectivamente, os principais componentes da parede celular dos fungos. Já o segundo mecanismo de ação é indireto, com a liberação de elicitores não específicos devido à ação lítica dessas enzimas (Van Loon; 1999).

Atualmente são classificadas em 17 famílias distintas, baseando-se na similaridade das seqüências de aminoácidos, relação sorológica e/ou atividade enzimática ou biológica. Muitas apresentam atividade antimicrobiana comprovada ou podem ativar outras respostas de defesa em plantas (Cavalcanti, 2005). Muitas vezes, a indução de uma mesma proteína-RP ocorre a partir de diferentes situações, como o ataque por um patógeno ou um estresse salino. Isto reforça a importância das proteínas-RP como proteínas de estresse, com funções que excedem o seu envolvimento nas interações planta-patógeno. Por outro lado, existem indutores de resistência que não ativam as proteínas-RP, como algumas rizobactérias, podendo-se dizer, definitivamente, que o acúmulo de proteínas-RP não é um pré-requisito para a indução de resistência. Entretanto, dada a ação antipatogênica de algumas dessas proteínas, elas provavelmente contribuam para o estado de proteção contra patógenos (Van Loon, 1997).

Entre as proteínas-RP mais pesquisadas estão as β -1,3-glucanases (RP-2) e as quitinases (RP-3), que possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos. Essas hidrolases ocorrem nas plantas e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, uma vez que os polímeros acima mostram-se como os principais constituintes da parede celular fúngica (Labanca, 2002). A família RP-2 é constituída por endo- β -1,3-glucanases e são agrupadas em pelo menos três classes distintas. As glucanases da classe I são proteínas básicas, localizadas no vacúolo, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas, enquanto que as classes II e III incluem, principalmente as proteínas ácidas extracelulares. Atuam na hidrólise do polímero β -1,3-

glucana, componente estrutural da parede celular de muitos fungos, particularmente na extremidade de hifas em que a glucana está mais exposta, causando um enfraquecimento da parede, resultando na morte celular dos fitopatógenos. A família RP-3 é constituída por endoquitinases que são agrupadas em seis classes distintas (I,II, IV, V, VI e VII), atuando diretamente nas paredes celulares de fungos, hidrolisando os polímeros de quitina, enfraquecendo-a e tornando as células osmoticamente sensíveis (Guzzo, 2004).

As peroxidases são glicoproteínas capazes de catalizar a produção de H_2O_2 , a formação de lignina, incorporação de glicoproteínas à parede celular, destruição peroxidativa do ácido indolilacético e de outros reguladores de crescimento. As peroxidases, bem como outras enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, atuam sobre as espécies ativas de oxigênio de modo a livrar a célula de seu efeito deletério. Podem funcionar no processo de reparo da célula nas injúrias, na síntese de lignina, bem como em diversos processos fisiológicos, como senescência, produção de etileno e oxidação de compostos fenólicos (Greppin et al., 1986). Assim, em função de sua participação na síntese de lignina e oxidação de compostos fenólicos, a peroxidase pode contribuir na resistência das plantas contra fitopatógenos (Van Loon, 1986).

2.5 Indução de resistência

A resistência induzida em plantas, também conhecida como indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida, envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (Bonaldi, 2005). O termo indução de resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também pode indicar uma resistência sistêmica, que se manifesta a distância do local de aplicação do indutor (Moraes, 1992).

A resistência induzida consiste no aumento da resistência por meio da utilização de agentes externos, sem qualquer alteração no genoma da planta, isso ocorrendo de maneira não específica por meio da ativação de genes envolvidos em diversas respostas de defesa, tais como, explosões oxidativas, respostas de hipersensibilidade, acúmulo de proteínas-RP, síntese de inibidores de proteinases, enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides,

como a fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase, enzimas envolvidas na peroxidação de lipídios, síntese de fitoalexinas, acúmulo de compostos fenólicos, aumentos na atividade de β -1,3-glucana sintase e conseqüente aumento na formação de calose, formação de papila, bem como o acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do microrganismo (Kuhn, 2007).

A indução da resistência pode ser desencadeada pela aplicação de substâncias naturais e/ou sintéticas, por microrganismos inativados e/ou por suas partes (Cavalcanti, 2000). Os indutores naturais normalmente são constituídos por moléculas de oligossacarídeos constituintes da parede celular de patógenos como glucanas, derivados de quitina, glicoproteínas e, ainda, polissacarídeos da parede celular vegetal (Hann, 1996). Foi verificado que as elicinas, uma família de pequenas proteínas altamente conservadas, secretadas por espécies de fungos fitopatogênicos do gênero *Phytophthora* ou *Pytium*, são capazes de ativar respostas de defesa em plantas e a resistência sistêmica adquirida (RSA). Plantas de fumo previamente tratadas com elicinas, especialmente a criptogéina, purificada de cultura de *Phytophthora cryptogea*, adquirem resistência a uma infecção subsequente com o patógeno *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* e a outros agentes patogênicos (Etienne et al., 2000 e Ricci et al., 1989, citados por Guzzo, 2004). Dentre as substâncias sintéticas, destaca-se o ácido salicílico e seus análogos funcionais, como o acibenzolar-S-methyl (ASM) e o ácido 2,6- dicloroisonicotínico (INA), entre os mais estudados. Outras moléculas têm se destacado, também, por sua capacidade de induzir resistência, a exemplo do etefon, uma substância que libera etileno, ácido jasmônico e ácido β -aminobutírico, silício, fosfatos e diversos sais inorgânicos (Sobrinho, 2004).

O efeito protetor pode durar poucos dias ou por todo o ciclo da cultura, como é o caso de plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium*, onde a proteção mostrou-se efetiva por 10 semanas (Pascholati & Leite, 1995). Outro aspecto interessante da indução de resistência diz respeito a ausência de especificidade, o que é refletido não somente pelos diferentes indutores passíveis de uso, mas também pelo amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida (Sticher et al., 1997). Por exemplo, plantas de pepino submetidas a tratamentos foliares com *C. lagenarium* ou vírus da necrose do fumo (TNV) como indutores, mostraram-se sistemicamente protegidas contra dez

patógenos diferentes, sendo cinco fungos, três bactérias e dois vírus (Hammerschmidt & Dann, 1997).

Os agentes indutores de origem biótica ou abiótica, capazes de ativar ou induzir resposta de resistência nas plantas são chamados de elicitores (Smith, 1996), podendo apresentar natureza química variada, como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (Stangarlin et al., 1999). Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva a ativação dos mecanismos de defesa das plantas. Um dos primeiros eventos na interação planta-patógeno é a explosão oxidativa, que se constitui na produção de espécies reativas de oxigênio, que pode resultar em reação de hipersensibilidade. Outra molécula sinalizadora é o óxido nítrico que atua na sinalização da via do ácido salicílico e na ativação de genes, como o da fenilalanina amônia-liase que estimula a via dos fenilpropanóides, o que resulta na produção de vários compostos de defesa de plantas, como as fitoalexinas (Beltrame, 2005).

Após a emissão do sinal primário, duas rotas metabólicas estão envolvidas na síntese de compostos de defesa: uma dependente de AS e outra independente de AS. No primeiro caso, o composto sinalizador é o próprio AS e na outra rota os sinalizadores são o etileno e/ou o ácido jasmônico (Kunkel & Brooks, 2002). No geral, as plantas respondem mais aos patógenos biotróficos, com a ativação da rota do AS, porém ativam a rota do etileno-jasmonato quando atacadas por patógenos necrotróficos ou herbívoros (Ton et al., 2002).

O ácido salicílico (AS) é provavelmente sintetizado na via dos fenilpropanóides, tendo o ácido benzóico como precursor. Na síntese através desta via, é importante a participação da FAL. Logo após a síntese, o AS é convertido na forma conjugada com carboidratos. Sendo que a conjugação pode ser um importante mecanismo pelo qual a concentração de AS é regulada na planta. O AS, quando aplicado de forma exógena, é capaz de induzir aumento da síntese do próprio AS, assim como de proteínas-RP e de proteger as plantas contra ataque de patógenos (Moraes, 1998). O AS pode gerar em várias plantas a produção de um composto volátil, o metil-salicilato (MeSA). O MeSA, por sua vez, pode induzir plantas a sintetizar o AS. Plantas de fumo infectadas por TMV são capazes de produzir o MeSA, que age como um indutor de resistência volátil. A produção de AS a partir do MeSA

produzido pela planta atacada induz a produção de proteínas-RP e a ativação de genes de resistência, podendo tornar plantas resistentes ao ataque de patógenos (Shulaev et al., 1997).

O ácido jasmônico e seus derivados encontram-se largamente distribuídos nos tecidos vegetais. Segundo Sticher et al. (1997), os jasmonatos (JA) são produzidos em plantas após injúrias ou tratamentos com elicitores, apresentando funções hormonais e de defesa contra fitopatógenos e insetos. A ação de defesa está ligada à capacidade de induzir a síntese ou acúmulo de proteínas inativadoras de ribossomos, FAL, tionina, sintase da chalcona, proteínas ricas em hidroxiprolina, inibidores de proteinases e outros enzimas como polifenoloxidasas e lipoxigenases (Bostock, 1999). A via de sinalização na qual os JA estão envolvidos tem diferenças marcantes em relação à via de sinalização que envolve o AS. Atualmente, costuma-se diferenciar o tipo de resistência envolvido com cada via. O tipo de resistência que envolve os JA é referido como resistência sistêmica induzida (RSI) e a do AS como resistência sistêmica adquirida (RSA). O papel dos JA na sinalização e mesmo na resposta de defesa da planta, é menos esclarecido do que a do AS. No entanto, o JA é proposto como um sinalizador secundário da RSI (Sticher et al., 1997). Inúmeros estudos evidenciam a importância dos JA na resposta de defesa das plantas contra fitopatógenos (Bostock, 1999).

O etileno é um hormônio vegetal volátil de múltiplas funções fisiológicas em plantas e é produzido como consequência de injúria, de tratamento com elicitores e através de vários processos metabólicos. Embora a participação do etileno na RSI ou na RSA não seja clara, alguns estudos mostram sua necessidade para a expressão de resistência (Knoester et al., 1999). Entretanto, outros indicam que a síntese de etileno após uma infecção deve ser um sintoma e não uma causa da indução de respostas de defesa (Sticher et al., 1997). O tratamento com etefon (liberador de etileno) leva algumas plantas a expressarem proteínas-RP, indicando a possibilidade do etileno ter participação na expressão da resistência (Jacobs et al., 1999).

O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias (Sobrinho, 2004). O fenômeno já é conhecido desde o começo do século passado, tendo, como

marco inicial, o trabalho desenvolvido por Chester, em 1933. Em 1961, Ross demonstrou que plantas de fumo submetidas a uma infecção prévia com o vírus do mosaico do fumo (“tobacco mosaic virus” - TMV) se tornavam resistentes a uma nova infecção do vírus. Um ano antes, Cruickshank e Mandryk obtiveram plantas de fumo resistentes ao mofo azul pela inoculação das hastes das plantas com *Peronospora tabacina* (Labanca, 2002).

Segundo Labanca (2002), existem vários indutores de resistência no mercado mundial: o Oryzemate®, o Bion®, o Messenger®, o Oxycom TM e o Elexa®. O Oryzemate® (probenazole) é um produto para proteção do arroz contra a brusone que já conta com mais de 20 anos de mercado no Japão e sem que haja um único relato de surgimento de resistência em populações de *Pyricularia grisea*. Além desses indutores comerciais, diversos agentes vêm sendo estudados como possíveis elicitores de respostas de defesa ou indutores de resistência. Esses agentes podem incluir um produto químico, como, entre outros, o ácido salicílico, o ácido β -amino butírico (BABA), etefon, e o metil salicilato, o estresse de natureza biótica ou abiótica, um patógeno avirulento, parte de um patógeno, como uma glicoproteína ou um carboidrato estrutural, um organismo não patogênico, como as bactérias promotoras de crescimento ou a levedura *S. cerevisiae*. Além do uso em campo, alguns indutores de resistência, como a luz UV, têm também potencial para uso em pós-colheita.

Segundo Cardoso Filho (2003), inúmeros trabalhos evidenciam o potencial da levedura *S. cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência e na proteção de plantas contra fitopatógenos. Recentemente, o grupo de pesquisas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, do setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ), liderado pelo Prof. Pascholati, demonstrou o efeito de suspensões de células dessa levedura (linhagem de panificação), e do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas de sorgo contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum* (Piccinin, 1995), de milho contra *C.graminicola* e *E. turcicum* (Silva & Pascholati, 1992; Stangarlin & Pascholati, 1994), de maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. *passifora* (Piccinin, 1995) e de eucalipto contra *Botrytis cinerea* (Piccinin, 1995). Em outros resultados, evidenciaram a obtenção de elicitores glicoproteicos de *S. cerevisiae*, os quais estimulam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (Wulff & Pascholati, 1998, 1999; Labanca, 2002).

É muito provável que a resistência induzida por *S. cerevisiae* esteja ligada à presença de determinados carboidratos e glicoproteínas presentes em sua parede

celular (Pascholati, 1999). De acordo com Labanca (2002), a parede da levedura é formada basicamente por polissacarídeos e proteínas, com a seguinte distribuição aproximada, em peso: 50 % β -1,3-glucanas, 10 % β -1,6- glucanas, 40 % manoproteínas e 1-3 % quitina. A autoclavagem de células de *S. cerevisiae* leva a liberação de diversos polímeros e oligômeros com massa molecular, carga e conteúdo de açúcares e de proteínas bastante variável. Wulff & Pascholati (1999) extraíram uma glicoproteína carregada negativamente (em pH 8), cuja porção protéica é importante para a indução da síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotiólico (acibenzolar-S-metil, ASM, BTH, CGA 245704, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (Mazaro, 2007). Guzzo et al. (2001) verificaram o efeito de acibenzolar-S-metil em cafeeiro suscetível a *Hemileia vastatrix* e observaram indução de proteção à planta. Os mesmos autores observaram ainda, por microscopia de fluorescência, que o ASM aplicado *in vitro* não interfere na germinação dos esporos e na formação de apressórios de *H. vastatrix*, concluindo que o ASM não possui ação antimicrobiana direta a esse patógeno, mas induz a expressão de genes de resistência para a formação de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento ou desenvolvimento deste patógeno.

O acúmulo de proteínas-RP também foi observado em tomate pelo uso de ASM, com acúmulo de quitinases, β -1,3-glucanases, além de peroxidases e lisozimas (Inbar et al., 1998). Em plântulas de melão tratadas com ASM, foi observado o aumento da atividade das proteínas-RP quitinases e peroxidases (Buzi et al., 2004). A aplicação em pré-colheita com ASM, em associação com azistrobina, foi eficaz na proteção dos frutos de mamoeiro em pós-colheita contra antracnose, reduzindo a incidência e severidade de doenças e induzindo os maiores níveis de atividade de proteínas-RP, β - 1,3-glucanases, quitinases e peroxidases (Cia, 2005).

Segundo Guzzo (2004), a identificação de genes de hospedeiros envolvidos em respostas de defesa é importante para a elucidação dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos. A seleção diferencial de bibliotecas de cDNA, produzidas a partir de RNA mensageiros (mRNAs) isolados de plantas inoculadas, tratadas

com elicitores ou indutores de resistência e de cultura de células, tem sido utilizada para identificar genes relacionados à defesa em muitas interações hospedeiro-patógeno.

2.6 Genômica funcional

Os seres vivos apresentam milhares de genes, dos quais apenas uma fração é expressa em cada célula individual. Então, é o programa temporal e espacial de expressão dos genes que determina os processos da vida. O desafio atual é identificar e caracterizar os genes expressos em determinadas condições fisiológicas e metabólicas nas células (Alcalde, 2002). Sabe-se, que o fluxo da informação gênica do DNA (genoma) até o proteoma é intermediado pelo conjunto das moléculas de RNA (transscissoma). Assim, a concentração relativa dos transcritos de um determinado gene em uma célula é um indicativo do quanto esse gene está sendo expresso, em virtude de um dado estímulo ambiental.

Pode se dizer que um gene está se expressando quando ele está sendo transcrito em RNA mensageiro (mRNA). O processo de transcrição dos genes, codificando proteínas, acontece no núcleo da célula, através da ação da RNA polimerase II que se liga ao promotor do gene na presença de proteínas chamadas de fatores de transcrição e ATP, abrindo a fita dupla de DNA e iniciando a síntese de transcrito primário. Para ser funcional o mRNA deve passar por um processo de maturação que envolve a formação de 'cap' na extremidade 5', adição do poli A na extremidade 3', e remoção dos introns. O mRNA maduro é exportado do núcleo para o citoplasma, através dos poros do envelope nuclear. No citoplasma, o mRNA pode ser então direcionado para locais específicos e traduzidos em proteínas no retículo endoplasmático rugoso.

A descoberta da enzima transcriptase reversa, uma DNA polimerase dependente de RNA encontrada predominantemente em vírus de RNA de tumor, tornou possível a síntese *in vitro* de DNA usando-se como molde mRNA. O DNA produto dessa reação é chamado DNA complementar (cDNA). A síntese e possível clonagem de cDNAs contribuíram para grandes avanços na análise da estrutura e expressão de genes de eucariotos e procariotos e propiciaram uma revolução tecnológica. Uma vez que o cDNA é cópia da mensagem, ele não contém introns e apresenta significativamente poucas seqüências que não codificam para proteínas. A ausência de introns facilita a determinação direta da seqüência da

mensagem e subsequente dedução da seqüência de aminoácidos da proteína por ela codificada. Isso tem resultado na identificação da seqüência de uma enorme quantidade de proteínas, algumas vezes mesmo antes de terem sido identificadas genética ou bioquimicamente (LGV, 2008).

Segundo Nogueira (2004), vários projetos cujo objetivo é estudar o transcrito, ou seja, a população de RNAs transcrita de um determinado organismo, vêm sendo conduzidos em diferentes espécies vegetais, denominados projetos EST (*Expressed Sequence Tag* ou Etiqueta de Seqüências Expressas). Esses projetos são uma poderosa ferramenta para identificar genes expressos em determinados tecidos e/ou tipos celulares de interesse.

Nos projetos EST, bancos de dados contendo pequenas seqüências de DNA são gerados a partir do seqüenciamento de moléculas de cDNA, sintetizadas a partir das populações de mRNA, empregando iniciadores específicos do vetor (plasmídeo), o qual foi utilizado no processo de clonagem gênica. Essas seqüências são usadas no procedimento de montagem dos *contigs* ou *clusters* que, na maioria das vezes, possuem *ORFs* (*open reading frames*) representando a região codificadora de diversos genes (Telles et al., 2001). Desta forma, a tradução destas *ORFs* fornece os primeiros indícios da função da proteína codificada por um determinado clone de cDNA. ESTs produzem informações biológicas de centenas de genes de um organismo, além de permitirem a identificação de diferentes isoformas de transcritos (Andrews et al., 2000) e o mapeamento gênico (Schuler, 1997; Wu et al., 2002). Outro aspecto importante dos ESTs é o acesso a informações sobre os genes expressos em organismos que contêm um genoma complexo.

A obtenção de ESTs permite a comparação de seqüências entre espécies diferentes, baseando-se na observação de que genes responsáveis pela mesma função, em organismos diferentes, são conservados durante a evolução. O emprego desta metodologia permite a identificação de genes, descobrimento de novos genes, reconhecimento de exons, caracterização dos limites éxons/íntrons, formação de famílias de proteínas, desenvolvimento de mapas gênicos, identificação de genes específicos de tecidos ou organismos, investigação de genes de função desconhecida e estabelecimento de padrões de expressão gênica espacial e temporal (Adams et al., 1995, Boguski et al., 1995, Banfi et al., 1996; Hillier et al., 1996; Lluisma et al., 1997).

Exemplos de construção de bibliotecas de cDNA podem ser vistos na cultura do tomate (*Lycopersicon esculentum*), onde foram obtidas mais de 150.000 ESTs a partir de 26 bibliotecas de cDNA, estas seqüências compreendem a base de dados de ESTs do tomate em The Institute for Genomic Research (TIGR, <http://www.tigr.org/tdb/tgi/lgi/>) (Hoeven et al., 2002). As empresas North Central Soybean Research e United Soybean Board subsidiaram o projeto de ESTs para a soja. O objetivo do programa foi gerar mais de 200.000 ESTs, representando genes expressos em diversos tecidos, órgãos e condições ambientais. Para esta espécie, aproximadamente 65 bibliotecas de cDNA foram criadas (Maguire et al., 2002).

Projetos de obtenção de ESTs para *Arabidopsis*, trigo, milho e arroz, entre outras plantas também são encontrados. O número de ESTs conhecido para estes organismos, segundo o banco de dados de ESTs do National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>), é de mais de 188.000 ESTs para *Arabidopsis*, 499.000 para trigo, 360.000 para milho e 260.000 para arroz (Barsalobres, 2004).

No Brasil, diversos projetos de construção de bibliotecas de cDNA são encontrados. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR), financiaram o projeto de obtenção de ESTs de cana-de-açúcar (SUCEST – Sugarcane EST Project) e 26 bibliotecas de cDNA foram construídas a partir da extração de RNA total de várias fontes: calos, raízes, diferentes estágios de folhas, colmos, plantas infectadas com patógenos, etc. (Vettore et al., 2001). Mais de 237.000 ESTs foram obtidas resultando em 43.141 clusters, que são agrupamentos das ESTs de acordo com o alinhamento das seqüências consenso no sentido 5' (Telles & DaSilva, 2001). O Centro APTA Citrus Sylvio Moreira, Instituto Agrônomo de Campinas com apoio do CNPq/Institutos do Milênio/Citrus, construíram 33 bibliotecas de cDNA a partir diferentes tecidos de espécies e gêneros de citros em diferentes estágios de desenvolvimento, sob estresse biótico (patógenos) e abióticos (seca) gerando um total de 242.790 ESTs (Targon et al., 2007).

No caso do eucalipto, foram conduzidos no Brasil, através de iniciativas de diversas empresas do setor florestal juntamente com universidades e órgãos nacionais de fomento à pesquisa, dois projetos de sequenciamento de ESTs de diferentes

espécies e tecidos. O Projeto FORESTS que resultou na construção de um banco de dados com 123.889 ESTs e o Projeto GENOLYPTUS que resultou no sequenciamento de cerca de 135.000 ESTs (Poke et al., 2005).

A informação dos projetos genoma, que agrupam seqüências de milhares de genes, apresenta a possibilidade de utilização das mesmas para identificar o nível de expressão dos mRNAs e o entendimento da função biológica de um determinado gene (Salvatierra, 2006). A obtenção de ESTs é um meio rápido e efetivo de produzir seqüências parciais para a maioria dos genes expressos (Nogueira et al., 2003). A comparação de uma seqüência desconhecida com o vasto número de ESTs é um instrumento importante e poderoso da pesquisa genética, e bancos de dados destas seqüências estão sendo utilizados na montagem de ferramentas para a análise em larga escala da expressão gênica. A partir de projetos ESTs, que produziram uma gigantesca quantidade de seqüências expressas, surgiram novas técnicas capazes de avaliar os níveis relativos de mRNA de milhares de genes simultaneamente (Barsalobres, 2004).

Metodologias para a análise da expressão diferencial de genes são empregadas para identificar genes envolvidos no processo de desenvolvimento e de resposta celular a uma variedade de estímulos químicos ou físicos, pesquisar o efeito molecular originado por mutações em um gene de interesse, identificar marcadores moleculares de doenças e estudar o efeito do tratamento com algumas drogas (Carulli et al., 1998). O principal objetivo deste tipo de estudos é construir uma ponte, sobre o espaço existente entre genótipo e fenótipo, reconhecer quais são os genes que são responsáveis por determinados processos tais como doenças, quais são os responsáveis por diferentes tipos de resposta à fatores bióticos e abióticos, como a resposta imune dos organismos à presença de patógenos, entre outros. Mas, para tudo isto, é necessário extrair o máximo de informação dos dados de seqüências mediante a análise de todo tipo de seqüências codificantes e não codificantes, tais como as seqüências promotoras, reguladoras e moduladoras (Salvatierra, 2006).

Até pouco tempo atrás, a análise da expressão gênica era feita com metodologias que avaliavam poucos genes de cada vez: Northern blot, dot blots, RT-PCR, entre outros. O crescimento exponencial do número de novos genes descobertos nos projetos genoma e o desenvolvimento dos arranjos de DNA propiciaram uma nova abordagem nos

estudos da regulação gênica, tornando possível o monitoramento dos níveis de transcritos de um grande número de genes simultaneamente (Felix, 2002).

O SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) é uma metodologia baseada em seqüenciamento utilizada na avaliação da expressão gênica. Essa técnica se baseia no isolamento de pequenas moléculas de cDNA que são concatenadas, clonadas e, em seguida, seqüenciadas. A partir do seqüenciamento pode-se avaliar a quantidade e a identidade dos transcritos celulares (Velculescu et al., 1995).

Outros exemplos de técnicas capazes de avaliar os níveis relativos de mRNA de milhares de genes simultaneamente são os *micro* e *macroarray* (micro e macroarranjos de DNA). Os arranjos de DNA são constituídos de um suporte sólido (membranas de náilon ou placas de vidro) onde ESTs, produtos de PCR ou mesmo oligonucleotídeos são depositados de maneira ordenada. Os arranjos são então expostos para hibridização com uma população de mRNA convertido pela transcriptase reversa em DNA complementar (cDNA) na presença de nucleotídeos modificados (com fluorescência ou radioisótopos). Quando hibridizado ao DNA preso na plataforma, este cDNA marcado emite um sinal, que é detectado por um scanner e convertido em uma leitura quantitativa relativa ao nível de expressão do gene (HAL et al., 2000). O sinal produzido é proporcional à sua concentração na população original (Perret et al., 1998).

Os arranjos de DNA (micro e macroarranjos) podem ser diferenciados por três características: o suporte sólido empregado, o método de detecção e o número de genes analisados. Quanto aos suportes, os microarranjos utilizam slides de vidro ou chips de silício, enquanto os macroarranjos utilizam membranas de náilon. A marcação pode ser feita por meio de fluoróforos (Cy3 e Cy5) em microarranjos e por isótopos radioativos (^{32}P ou ^{33}P) em macroarranjos. Em relação ao número de genes representados no suporte, os microarranjos podem analisar até 20.000 genes, enquanto que os macroarranjos analisam até 5.000 (Skena et al., 1995; Lashkari et al., 1997; Kozian & Kirschbaum, 1999 citados por Barsalobres, 2004). Ambos baseiam-se no princípio de quanto maior a expressão de um determinado gene, em uma determinada condição (biológica ou ambiental), maior será o número de moléculas de mRNA referente àquele gene, sendo maior o número de cDNAs marcados na sonda sintetizada e, conseqüentemente, maior o valor de intensidade de sinal detectado quando a sonda é hibridizada com a seqüência específica de DNA (Felix et al., 2002).

Outros sistemas utilizando arranjos de DNA são os fornecidos pelas empresas Affymetrix® e Agilent®. Denominado “Genechip DNA” tem o princípio básico semelhante ao da técnica de arranjos, entretanto, os genes são representados por oligonucleotídeos (15-25 pb) fixados em lâminas de vidro. A técnica permite a preparação de lâminas de alta densidade.

2.7 Projetos de genômica com eucalipto

A era da genômica florestal começou com projetos de EST em *Pinus* e *Populus* e teve como objetivo inicial a identificação de genes específicos de espécies arbóreas (BHALERAO et al., 2003). Os trabalhos pioneiros sequenciaram 5692 ESTs de *Populus* (STERKY et al., 1998) e 1000 ESTs de *Pinus* (Allona et al., 1998). Desde então, já estão disponíveis nos bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mais de 359002 ESTs de *Pinus* sp. e mais de 369238 de *Populus* sp. Além disso, estão sendo também depositadas seqüências de ESTs de espécies de *E. gunnii* (19.841); *E. globulus* (blue gum) (10.003), *E. globulus* subsp. *bicostata* (2.685), *E. grandis* (1.574); *E. tereticornis* (1.131); *E. grandis* x *E. nitens* (44) e *E. globulus* subsp. *globulus* (2), que já somam aproximadamente 35.279 ESTs no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html, consultado em 11/abr/2008). Variados esforços estão sendo desenvolvidos com *Eucalyptus* utilizando ferramentas genômicas em países como Austrália, França, África do Sul, China, e outros (Poke et al., 2005). No Brasil, os projetos GENOLYPTUS e FORESTs têm destaque internacional.

O GENOLYPTUS é uma iniciativa de diversas empresas do setor florestal, juntamente com universidades e órgãos nacionais de fomento à pesquisa, que resultou no sequenciamento de cerca de 150.000 ESTs, provenientes de bibliotecas preparadas a partir de diversos tecidos e partes da planta, em diferentes estágios de desenvolvimento e sob tratamentos distintos, além de algumas bibliotecas de DNA genômico.

O projeto FORESTs (EUCALYPTUS GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORCIUM) agrupa quatro das maiores companhias da área de papel e celulose do Brasil, Votorantim Celulose e Papel (VCP), Ripasa Celulose e Papel, Suzano de Papel e Celulose e Duratex, junto com o Projeto Genoma Agrônômico e Ambiental

(Agronomical and Environmental Genome - AEG), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), compreende 20 laboratórios em diferentes instituições de pesquisa no estado de São Paulo. O projeto resultou na construção de um banco de dados com 123.889 ESTs obtidos a partir de tecidos diferentes, incluindo plantas jovens (SD), raiz (RT), madeira (WD), casca (BK), calos (CL), folhas (LV), os internódios da haste (ST), seedlings (SL). Os cDNAs foram preparados à partir do mRNA poli adenina (poliA+), usando o Kit de plasmídeo (Gibco-BRL EUA) ou o kit da síntese do ZAP-cDNA (Stratagene EUA). Os cDNAs dupla fita foram fracionados, e os fragmentos maiores que 1 kb foram usados. O sequenciamento foi feito usando terminais de BigDye em eletroforese multi-capilar de um seqüenciador de DNA prisma 3700 da ABI (Perkin Elmer EUA). Os conjuntos de ESTs foram construídos pelo alinhamento usando o programa CAP3.

A construção de bancos de dados de ESTs e a grande quantidade de dados gerados vêm contribuindo para o entendimento de diversos processos biológicos na cultura do eucalipto, pois facilita a análise das proteínas codificadas por diversas partes do genoma e permitem a análise da expressão entre diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e condições ambientais.

CAPITULO I

EFEITO DE INDUTORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA ATIVIDADE DE QUITINASE E PEROXIDASE E NO CONTROLE DA FERRUGEM CAUSADA POR *Puccinia psidii* EM EUCALIPTO

Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto

Leonardo Pires Boava ^{1,2} *

¹ Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, 18603-970, Botucatu, SP.

² Bolsita FAPESP

* E-mail: leoboava@yahoo.com.br

RESUMO

Verificou-se o efeito de indutores de resistência bióticos e abióticos nas atividades de quitinase e peroxidase e na redução da severidade da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii*. Para isso, mudas de dois clones de eucalipto com sessenta dias de idade mantidas em casa de vegetação receberam tratamentos com Acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos, *Saccharomyces cerevisiae*, Dipel, Ecolife ⁴⁰ e Crop-set, cinco dias antes da inoculação com o patógeno. Uma suspensão de uredosporos de *P. psidii*, coletados a partir de plantas infectadas naturalmente, foi calibrada para 5×10^4 uredosporos/ mL. A inoculação foi realizada na face dorsal das folhas e a avaliação se deu 15 dias após, estimando-se a severidade da doença por meio de uma escala de notas. Os tratamentos Acibenzolar-S-metil (ASM), *S. cerevisiae* e Ecolife apresentaram melhores resultados de controle da doença e os demais tratamentos não se mostraram eficazes para o controle. A determinação das atividades de quitinase e peroxidase envolveu apenas os dois primeiros tratamentos (ASM e *S.*

cerevisiae). O aumento de atividade das enzimas foi observado em ambos os clones, previamente tratados com os indutores, 48 horas após a inoculação com fungo.

Palavras-chave: indução da resistência, doenças, ferrugem das mirtáceas.

ABSTRACT

In this work was observed the effect of biotic and abiotic inducers of resistance for *Eucalyptus* rust control evaluated by the severity of the disease and biochemical analyses of the activities of chitinase and peroxidase. For this work was obtained plants of 60 days old, were kept in a greenhouse and received treatments with Acibenzolar-S-methyl (ASM), Agro-Mos, *Saccharomyces cerevisiae*, Dipel, Ecolife 40 and Crop-set five days before the inoculation with the pathogen. Urediniospores of *P. psidii* were collected from plants naturally infected, and carried out suspension of 5×10^4 spores/mL. The inoculation was conducted in the abaxial surface of the leaves and disease assessment was carried out 15 days after inoculation based on a rust rating scale with four class of severity. Treatments with Acibenzolar-S-metil (ASM), Agro-Mos e *S. cerevisiae* showed better results of control. And the other treatments were not effective for control. The determination of the activities of chitinase and peroxidase showed increased activity in both clones 48 hours after inoculation with pathogen, coinciding with the reduction of the disease provided by the action of inducers.

INTRODUÇÃO

A importância da cultura do eucalipto para o Brasil pode ser avaliada pela participação do setor florestal na economia do país. A estimativa do valor Bruto da produção vegetal no setor de florestas plantadas alcançou R\$ 49,8 bilhões, em 2007 (1). O sistema

agroindustrial florestal no segmento de florestas plantadas (primário e processamento industrial) em 2007 gerou aproximadamente 4,6 milhões de empregos, incluindo diretos (656 mil) indiretos (1,8 milhões) e empregos resultantes do efeito-renda (2,1 milhões).

Entretanto, como cultura inserida no Brasil, o eucalipto tem se mostrado suscetível à uma série de doenças, na sua maioria, provocada por fungos patogênicos desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Nos últimos anos tem ocorrido um significativo aumento na incidência de doenças na etapa de produção de mudas e em plantios de *Eucalyptus*, bem como o surgimento de novas enfermidades (2). Levantamentos efetuados em plantios seminais de *E. grandis* nas regiões do Vale do Paraíba e sul do Estado de São Paulo revelaram que 35% das árvores apresentavam ferrugem (*P. psidii*) aos 6 meses de idade. As plantas altamente infectadas tiveram reduções de 25 a 35% em altura e diâmetro quando comparada com as sadias (Takahashi, 2002).

O agente causal da ferrugem do eucalipto é o fungo *P. psidii* Winter que apresenta uma distribuição geográfica ampla. No Brasil a doença constitui um sério problema, principalmente devido à ocorrência de condições ambientais favoráveis praticamente durante todo o ano em algumas regiões. Desde 1973 perdas econômicas preocupantes de até 100% tem sido registradas sobre espécies do gênero *Eucalyptus* (5). O controle da ferrugem de acordo com Santos et al. (32), em condições de campo, não justifica os gastos com aplicações de fungicidas em função das perdas verificadas. As melhores práticas envolvem estratégias de escape evitando-se áreas propícias à ocorrência da doença ou evitando-se o plantio de materiais suscetíveis nas regiões favoráveis. Desse modo o uso da resistência genética é apontada como a melhor opção para o controle da ferrugem do eucalipto, devido à existência

de variabilidade no grau de resistência, tanto entre espécies de *Eucalyptus*, quanto entre procedências de uma mesma espécie.

A resistência induzida em plantas, também conhecida como indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida, envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com agentes bióticos ou abióticos (20). O termo indução de resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos onde se efetuou o tratamento com o agente indutor, como também pode indicar uma resistência sistêmica que se manifesta a distância do local de aplicação do indutor (27).

Os agentes indutores de origem biótica ou abiótica capazes de ativar ou induzir qualquer resposta de resistência nas plantas são chamados de elicitores (34), podendo apresentar natureza química variada como oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos e ácidos graxos, o que demonstra a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (36). Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva a ativação dos mecanismos de defesa das plantas.

A indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina. A detecção e quantificação da expressão dessas enzimas seria uma das formas de separar o efeito indutor de resistência do efeito tóxico direto de determinado produto (34). As proteínas-RP englobam famílias de proteínas com características variadas (quitinases, β -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases, osmotinas, dentre outras), mas com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese,

apresentando dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção em plantas (40).

Diante do exposto, para a elucidação dos mecanismos de ação dos indutores bióticos e abióticos no fenômeno de proteção do eucalipto contra fungo *P. psidii*, no presente trabalho procurou-se avaliar o potencial dos indutores na redução da severidade da doença correlacionando com capacidade dos indutores em alterar o metabolismo das plantas, com base na atividade das enzimas quitinase e peroxidase.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e manutenção das plantas

Foram utilizadas mudas clonais de eucalipto híbrido das espécies *E. grandis* x *E. urophylla*, denominados 'Urograndis', gentilmente cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel. Foram utilizados dois clones de reação resistência/suscetibilidade conhecida. Um clone resistente à ferrugem denominado C0 e um clone classificado como suscetível denominado VR. As mudas foram mantidas em vasos em casa de vegetação climatizada no setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP-Botucatu.

Tratamento com indutores bióticos e abióticos

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, onde cada planta representou uma repetição. Foram utilizadas plantas do clone VR (susceptível a ferrugem) com 2 meses de idade. Cada planta foi pulverizada com 15 mL de calda dos seguintes tratamentos: Acibenzolar-S-metil (50 ppm) (ASM), que consiste em um composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotiólico, derivado do

benzotriazol que é um análogo funcional do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor de resistência. O efeito da levedura *S. cerevisiae* foi verificado a partir do fermento biológico Fleischmann®. Para isso foi submetido a quatro autoclavagens de uma hora cada a 121 °C a 1 atm e entre os intervalos de autoclavagem, a suspensão foi retirada e resfriada em gelo por 20 minutos. Após as quatro autoclavagens a suspensão ficou em descanso por 2 horas para decantação, onde foi utilizado o sobrenadante. A aplicação nas plantas foi efetuada na dosagem de 200 mg/L. O produto Agro-Mos®, um mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede da levedura *S. cerevisiae* (Hansen), Improcrop Brasil, foi aplicado nas plantas em uma dosagem equivalente a 1,5 L/ha. A formulação da bactéria *Bacillus thuringiensis* utilizada no experimento foi uma formulação comercial chamada Dipel®, produzida pela empresa Abbott S/A, com o mínimo de 27,5 bilhões de bastonetes/ml de suspensão, que foi aplicado na dosagem de 20 mg/mL. O produto denominado Ecolife⁴⁰ (Quinabra S.A.) é um biofertilizante constituído por ácido ascórbico, cítrico e láctico, flavonóides e fitoalexinas cítricas o qual foi aplicado na dosagem de 0,6 L/ha. O produto comercial Crop-set é um fertilizante foliar a base de Citocininas, manganês, ferro e cobre foi aplicado na dosagem de 0,6 L / ha. Além das plantas do clone VR e C0 pulverizadas com esses indutores de resistência também foram utilizadas plantas inoculadas e não inoculadas com o fungo *P. psidii*.

Obtenção e manutenção do patógeno, método de inoculação e avaliação

Cinco dias após os tratamentos com os indutores as plantas foram inoculadas com uredosporos de *P. psidii* obtidos de plantas de eucalipto infectadas naturalmente no campo. A partir dessa coleta foi preparada uma suspensão com 5×10^4 uredosporos/ mL, em água destilada contendo Tween 80 (0,05%).

O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face dorsal das folhas com o auxílio de uma bomba de vácuo. Em seguida as plantas foram mantidas em câmara de crescimento regulada para 21°C, fotoperíodo de 12 horas e com alta umidade relativa. A avaliação da doença foi realizada 15 dias após a inoculação, estimando-se por meio de uma escala de notas, o tipo de reação à infecção, proposta por Aparecido et al.(2003), onde: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade; S1 = poucas pústulas sem esporulação; S2 = muitas pústulas, com esporulação; e S3 = muitas pústulas com grande esporulação.

Determinação das atividades enzimáticas

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Fisiologia do Parasitismo no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP. A determinação das atividades de quitinase e peroxidase envolveu apenas plantas que receberam tratamentos que se mostraram eficientes no controle da doença. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições onde cada planta representou uma repetição. O experimento foi representado por plantas do clone VR (suscetível à ferrugem) disposto em esquema fatorial 2 x 3 considerando plantas inoculadas e não inoculadas com *P. psidii* e plantas pulverizadas com acibenzolar-S-metil (ASM), com *S. cerevisiae* (S.c) 5 dias antes da inoculação e plantas que não foram tratadas com indutores de resistência. Além de plantas do clone C0 inoculadas e não inoculadas que foram utilizadas com padrão de resistência à ferrugem.

As amostras foram representadas pelo 1º par de folhas (com tamanho equivalente a 1/5 do comprimento foliar) e pelo 2º par de folhas (2/5 do comprimento total). A coleta se deu 48 horas após inoculação, as amostras foram mantidas em freezer –18 °C para posterior

obtenção do extrato protéico. Para as análises estatísticas os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Obtenção dos extratos protéicos

Amostras de 0,5 g de folhas correspondendo a cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em 4 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo 2,56 g de Polivinilpirrolidona (PVP) e Phenylmethanesulfonyl fluoride 5mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 20.000 g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado a -20°C. Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar as atividades de quitinase e peroxidase.

Metodologia para determinação da atividade de quitinase

A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4 mg mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH) (37). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foi misturado com 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg mL⁻¹). Após 20 minutos a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g / 5 minutos. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitin-RBV”). A concentração de proteínas expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um

mL de amostra (μg proteína mL^{-1}), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 μg mL^{-1} .

Metodologia para determinação da atividade de peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (26). A mistura da reação continha 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250 μL de guaiacol e 306 μL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorvância. min^{-1} .mg proteína $^{-1}$). A concentração de proteínas expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (μg proteína mL^{-1}), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 μg mL^{-1} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos indutores de resistência

A avaliação da doença foi realizada 15 dias após a inoculação, estimando-se por meio de uma escala de notas proposta por Aparecido et al. (5). De acordo com a escala, os tratamentos que obtiveram melhores resultados de resistência à ferrugem, de modo que foram classificados quanto ao tipo de infecção como S0 (ausência de pústulas), foram: Acibenzolar-S-metil (ASM), *S. cerevisiae* (S.c) e Ecolife⁴⁰ (Tabela 1). As plantas que receberam o tratamento Dipel, produto a base de *Bacillus thuringiensis*, apresentaram classificação S01. Os

tratamentos com Agro-Mos e Crop-set não foram eficazes para o controle da ferrugem de modo que foram classificados com S02 (muitas pústulas, com esporulação) (Tabela 1).

Tabela 1. Severidade da ferrugem do eucalipto, baseados na escala de notas proposta por Aparecido et al. (2003), em plantas tratadas com indutores de resistência bióticos e abióticos, avaliados 15 dias após inoculação com *P. psidii*

Tratamentos	Descrição	Escalas de notas da doença
1	Testemunha C0 inoculada	S0
2	Testemunha VR inoculada	S2
3	Acibenzolar-S-metil (ASM) + inoc.	S0
4	Agro-Mos + inoc.	S2
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> + inoc	S0
6	Dipel + inoc.	S1
7	Ecolife ⁴⁰ + inoc.	S0
8	Crop-set + inoc.	S2
9	VR s/inoculo	S0
10	C0 s/inoculo	S0

Os indutores podem atuar de diferentes maneiras, porém, sempre levando à ativação do sistema de defesa das plantas. O ASM é um análogo funcional do ácido salicílico, que age induzindo a ativação de genes que codificam proteínas-RP e enzimas relacionadas com a produção de fitoalexinas e lignina (12). O ASM tem se mostrado experimentalmente induzir resistência contra algumas doenças onde medidas eficazes de controle são raras ou mesmo ausentes, como a podridão radicular em tomateiro causada por *Fuarium oxysporum f. sp radicis-itycopersici* (7) e a virose provocada pelo Cucumber mosaic vírus (4).

Guzzo et al. (19) verificaram o efeito acibenzolar-S-metil em cafeeiro suscetível a *Hemileia vastatrix* e observaram indução de proteção à planta. Os mesmos autores observaram, pela microscopia de fluorescência, que o ASM aplicado *in vivo* não interfere na

germinação dos esporos e na formação de apressórios de *H. vastatrix*, concluindo assim, que o ASM não possui ação antimicrobiana direta aos patógenos, mas induz a expressão de genes de resistência para a formação de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento ou desenvolvimento destes patógenos.

Segundo Cardoso Filho (10), inúmeros trabalhos evidenciam o potencial da levedura *S.cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência e na proteção de plantas contra fitopatógenos. O grupo de pesquisas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica do setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ), liderado pelo Prof. Sérgio F. Pascholati, têm demonstrado o efeito de suspensões de células dessa levedura (linhagem de panificação), bem como do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas de sorgo contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum*, de milho contra *C.graminicola* e *E. turcicum*, de maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. passiflora e de eucalipto contra *Botrytis cinerea*. Em outros resultados, evidenciaram a obtenção de elicitores glicoproteicos de *S. cerevisiae*, os quais estimulam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo (42,25).

É muito provável que a resistência induzida por *S. cerevisiae* esteja ligada à presença de determinados carboidratos e glicoproteínas presentes em sua parede celular (41). De acordo com Labanca, (25) a parede da levedura é formada basicamente por polissacarídeos e proteínas, com a seguinte distribuição aproximada em peso: 50 % β -1,3-glucanas, 10 % β -1,6- glucanas, 40 % manoproteínas e 1-3 % quitina. A autoclavagem de células de *S. cerevisiae* leva a liberação de diversos polímeros e oligômeros com massa molecular, carga e conteúdo de açúcares e de proteínas bastante variável. Wulff & Pascholati (41) extraíram desse modo uma glicoproteína carregada negativamente (em pH 8), cuja porção protéica é

importante para a indução da síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

O Ecolife® se mostrou eficiente no controle de *P. psidii* baseados na escala de notas (Tabela 1). Resultados semelhantes também foram obtidos por Costa et al. (15), onde o composto Ecolife® reduziu a severidade da ferrugem do cafeeiro em até 73% em comparação a testemunha, evidenciando o efeito protetor desses produtos nas dosagens utilizadas. No entanto não se pode inferir que somente a indução de resistência tenha ocorrido, visto que o Ecolife® pode estar atuando diretamente sobre o patógeno apresentando um efeito antimicrobiano, em vista de outros autores terem detectado atividade antimicrobiana do produto. Segundo Cavalcanti et al. (11) foi sugerido que altas concentrações de polifenóis e moléculas correlatas observadas em Ecolife® induziram toxidez direta sobre colônias de *X. vesicatoria*, visto que a formulação é baseada em flavonóides, polifenóis e fitoalexinas extraídos de biomassa cítrica.

Segundo Bonaldo et al. (8) quando as plantas são expostas a indutores bióticos ou abióticos e ficam protegidas contra patógenos, não implica necessariamente que a indução tenha ocorrido, visto que o agente de controle pode estar induzindo resistência ou atuando diretamente sobre o patógeno, ou ambos ao mesmo tempo o que descaracterizaria o efeito da indução da resistência.

Atividade de quitinase

Tanto o clone VR como o clone C0, que não foram previamente tratados com ASM ou *S. cerevisiae* (S.c) apresentaram aumento de atividade da enzima quitinase 48 horas após inoculação com o fungo *P. psidii*, quando comparados com as respectivas testemunhas sem a presença do patógeno. No entanto, de acordo com Ryals (1996) citado por Junqueira (22) a rapidez e/ou intensidade com que a reação de defesa ocorre, determinará resistência ou

não ao patógeno. Assim durante o curso da interação entre os clones e o patógeno, efetivas isomorfias dessas enzimas podem não ser produzidas em quantidade suficiente, tempo e local correto, o que justificaria alta severidade da doença nas plantas do clone VR que não receberam tratamento com indutor de resistência. As proteína-RP são identificadas por seu simples acúmulo em plantas submetidas a uma situação de patogênese. Entretanto, estudos recentes têm mostrado que a super expressão de genes de quitinases em plantas, tem aumentado a resistência dessas plantas a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componentes principais das paredes celular dos fungos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (40).



Figura 1. Atividade de quitinase a partir de tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) cinco dias antes inoculação. As folhas foram coletadas 48 horas após inoculação. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5 % de probabilidade.

A presença do patógeno, após tratamentos com indutores bióticos ou abióticos, altera a magnitude dos eventos bioquímicos, bem como, promove o acionamento de outros

mecanismos, enquanto que, plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno apresentam menor magnitude desses eventos bioquímicos. Dessa forma, quando plantas são pré-inoculadas com um microrganismo ou tratadas com indutores abióticos de resistência sistêmica, embora pouco se observe em termos de alterações bioquímicas, a planta sistemicamente protegida reage de forma mais rápida e eficientemente ao desafio com um patógeno virulento (21).

O composto sintético ASM e o produto da autoclavagem da levedura *S. cerevisiae* obtido a partir fermento biológico Fleischmann®, quando aplicados nas plantas de eucalipto do clone VR, cinco dias antes da inoculação com *P. psidii*, contribuíram para um aumento significativo de atividade de quitinase, tanto nas plantas que não foram inoculadas como nas plantas inoculadas, quando comparadas com as plantas testemunhas que não receberam tratamentos ou inóculo (Figura 1). Resultados semelhantes foram apresentados por Sobrinho (35) no patossistema Caupi-*Macrophomina phaseolina* onde a atividade da enzima quitinase mostrou-se efetivamente aumentada nos tratamentos com ASM em associação com o patógeno ou isoladamente. Roncatto, (1997) evidenciaram que as preparações da levedura *S. cerevisiae*, tratadas termicamente ou não, ocasionaram aumentos na atividade dessas enzimas hidrolíticas presentes em folhas de milho.

O aumento da atividade da enzima pode estar ligado à capacidade do ASM e da levedura em ativar mecanismo de defesa da planta como a atividade hidrolítica da quitinase. Segundo Busi et al. (9) a expressão da resistência levada a efeito pela aplicação do ASM se deve ao incremento da atividade da enzima quitinase, a qual por uma ação direta, hidrolisa a quitina presente na parede celular dos fungos.

Entretanto, as plantas tratadas com os indutores não sofreram aumento de atividade da enzima 48 após inoculação com o fungo, ou seja, o incremento do nível de quitinase nas plantas tratadas com a levedura ou com o ASM foi em decorrência apenas da ação dos indutores. Fato que pode ter sido determinante para a eficiência no controle da ferrugem com visto na Tabela 1.

Atividade de peroxidase

Após inoculação com *P. psidii*, as plantas do clone C0 que não foram previamente tratadas com ASM ou *S. cerevisiae* (S.c) não apresentaram diferença significativa na atividade da peroxidase. Entretanto, as plantas do clone VR apresentaram aumento significativo na atividade da enzima 48 horas após a inoculação quando comparado com as plantas não inoculadas (Figura 2). Segundo Asada (6) a atividade dessa enzima pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade de diferentes hospedeiros e na presença de diferentes patógenos.



Figura 2. Atividade de peroxidase a partir de tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (susceptível) inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) cinco dias antes inoculação. As folhas foram coletadas 48 horas após inoculação. Colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5 % de probabilidade.

As peroxidases são glicoproteínas capazes de catalizar a redução de H_2O_2 , a formação de lignina, a incorporação de glicoproteínas à parede celular, a destruição peroxidativa do ácido indolilacético e de outros reguladores de crescimento. Assim, em função de sua participação na síntese de lignina e oxidação de compostos fenólicos, a peroxidase pode contribuir na resistência das plantas contra fitopatógenos (40).

Entretanto, esse aumento na atividade da peroxidase nas plantas do clone VR inoculadas (Figura 2) pode não ter relação direta com o sistema de defesa da planta, visto que, esse aumento de expressão pode não ter sido produzido em quantidade suficiente, tempo e local correto, o que justificaria alta severidade da doença nas plantas do clone VR, uma vez que essas plantas quando inoculadas apresentaram alta severidade da doença e foram classificadas como suscetíveis (Tabela 1).

Além disso, segundo Labanca (25), essas enzimas podem não ter uma relação direta com o estabelecimento da indução de resistência. Ray et al. (30) observaram que plantas de tomate transformadas para expressão de uma peroxidase de pepino tiveram um grande aumento na atividade das enzimas, no entanto, não foi verificado aumento de resistência dessas plantas a patógenos. Dalisay & Kuc (16) demonstraram que as peroxidases não têm relação direta com a indução de resistência em pepino e, portanto, não podem ser usadas como um marcador de resistência.

Embora as peroxidases não possam ser utilizadas como marcadores de resistência, a alteração na sua atividade é um indício de metabolismo alterado. Uma das funções das peroxidases é a formação da lignina pela polimerização de fenóis. Assim sendo, é esperado que alterações na atividade de peroxidases envolvam também alteração na atividade de outras enzimas presentes na mesma rota metabólica. Devido a estes fatos, as peroxidases são usadas

em estudos de indução de resistência, não como um marcador, mas sim como uma das muitas respostas de defesa manifestadas pelas plantas (25).

O comportamento enzima peroxidase não se mostrou diferenciado quando as plantas do clone VR foram previamente tratadas com Acibenzolar-S-metil (ASM), entretanto, quando tratadas com *S. cerevisiae* apresentaram aumento nos níveis de expressão da enzima, comparado com a testemunha que não recebera tratamento. Resultados semelhantes foram apresentados por Roncatto & Pascholati (31) usando preparações de células da levedura ou seus filtrados, tratadas ou não termicamente, que alteraram a atividade da peroxidase em tecidos de milho e sorgo. Segundo os autores, as alterações ocorridas na atividade da enzima nesses tecidos, quando do tratamento com *S. cerevisiae*, provavelmente deveram-se ao fato da planta "reconhecer" a levedura ou seus metabólitos e, portanto, alterar o metabolismo normal em resposta ao possível invasor.

Os maiores níveis de atividade da enzima foram encontrados em plantas do clone VR tratadas com ASM ou com *S. cerevisiae* e inoculadas com *P. psidii* (Figura 1), evidenciando que esse mecanismo foi acionado, apresentando maior expressão a partir do desafio com o patógeno em plantas pré-condicionadas pelo efeito dos indutores. O pré-condicionamento é um importante componente da resistência sistêmica induzida (14) e está associado ao aumento da capacidade para uma rápida e efetiva ativação das respostas de defesa celular, as quais são induzidas somente após o contato com o patógeno desafiante (13). Quando a planta é induzida pela presença de um elicitador, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada a uma planta induzida com o mesmo elicitador e posteriormente desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são

mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno (24).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati por permitir a realização desse trabalho no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de plantas do setor de fitopatologia da ESALQ-USP , à toda a equipe do laboratório em especial ao Dr Odair José Kuhn

À equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel (VCP), por cederem material contrastante para este estudo, nas pessoas de Cezar Bonine, Donizete C. Dias.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAF-Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas–Anuário estatístico da ABRAF 2008- disponível em <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp> Acesso em 02 de abril de 2008
2. ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; ROSA, O.P ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil..P; Fitopatologia brasileira, v.26, n.2, p.221, 2001
3. ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto, Viçosa, UFV, 2004. 442p
4. ANFOKA GH, 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acidS-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Volledung) to cucumber mosaic virus. *Crop Protection* 19, 401–5.

5. APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B., FURTADO, E.L. Efeito da idade e temperatura na germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* coletados de jambeiro (*Syzygium jambos*) e de goiabeira. *Summa Phytopathologica*, v.29, p.30-3, 2003
6. ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. *Physiological Plantarum*, v. 85, p. 235 -241, 1992
7. BENHAMOU N, BELANGER R., Benzothiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis* in tomato. *Plant Physiology* 118, 1203– 12. 1998
8. BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F., ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.
9. BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.152, n.1, p.34-42, 2004
10. CARDOSO FILHO, J.A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, Acilbenzolar-s-metil e *S. cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Telemorfo: *Guignardia citricarpa*) Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 125p., Piracicaba, 2003
11. CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; COSTA, J.C.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-Smetil e Ecolife na indução de resistência e

respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*).
Fitopatologia Brasileira, v.31, p.372-380, 2006.

12. COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. *Crop Protection* 267-273. 1999
13. CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant science*, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002
14. COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 61, p. 273-282, 2002.
15. COSTA, M.J.N., ZAMBOLIM, L. & RODRIGUES, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*. 32:150-155. 2007.
16. DALISAY, R.F.; KUĆ, J.A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 47, p. 315-327, 1995
17. FIGUEIREDO, M.B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. *Biológico*, São Paulo, v.63, n.1, p.29-32, 2001
18. GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*, 2004. 236p. Tese (Doutorado na área de energia nuclear na agricultura), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004
19. GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.68, n.1, p.89-94, 2001.

20. HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. cap.8, p.177-199.
21. HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. *Annals of Botany*, Oxford, v. 89, p. 503-512, 2002.
22. JUNQUEIRA, A.C.B, Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento. Dissertação (mestrado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 75p., Piracicaba, 2003
23. KRUGER; BACCHI, L. M. A. In: BERGAMIN, A. F.; KITAMI, H.; AMORIM, L. (Ed.) Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap.4
24. KUHN , O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2007
25. LABANCA, E.R.G. Purificação parcial de elicitores presentes em *S. cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002
26. LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.25, p. 244-249, 1999
27. MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. Pesquisa Agropecuária Brasileira,

Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992

28. PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In:LUZ, W.C.Revisão Anual de Patologia de Plantas,Passo Fundo:1994, v.2. p.1-51
29. RAYACHHETRY, M.B.; VAN, T.K.; CENTER, T.D.; ELLIOTT, M.L. Host Range of *Puccinia Psidii*, a Potential Biological Control Agent of *Melaleuca Quinquenervia* in Florida. *Biological Control*, Orlando, v. 22, n. 1, p. 38-45, 2001
30. RAY, H.; DOUCHES, D. S.; HAMMERSCHMIDT, R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Molecular Plant Pathology*, v.53, p.93-103, 1998 Rayachhetry et al., 2001
31. RONCATO, M. C.; PACHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). *Scientia Agricola*, v. 55, n.3, p. 395-402, 1998
32. SANTOS, A.F.; AUER, S.G.; GRICOLETTI JR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Circular técnica 45, EMBRAPA Floretas,1ºed, 19p, 2001
33. SILVEIRA, R. L.V.A.; HIGASHI, E.N...Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para a ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto CIRCULAR TÉCNICA IPEF n. 200, p. 01-13, dezembro de 2003
34. SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*, London, v. 132, p. 1-45, 1996
35. SOBRINHO.A.C. Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina*:método de detecção em sementes,esporulação e controle do patógeno Tese (Doutorado Fitopatologia)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,Universidade de São Paulo,139p.,Piracicaba, 2004
36. STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. S.; NOZAKI, M.H.

Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 2, p. 16-21, 1999.

37. STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.
38. TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. European Journal of Plant Pathology, v.107, n.1, p.39-50, 2000
39. THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 6, n. 4, p.351-357, 2003
40. VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-62. 2006.
41. WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Fito. Bras.,v.24, p.428-435, 1999
42. WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Scientia Agrícola,v.55, p138-143, 1998.

CAPÍTULO II

**ATIVIDADE DE QUITINASE E PEROXIDASE EM FOLHAS DE EUCALIPTO COM
DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO APÓS INOCULAÇÃO COM *Puccinia
psidii* E TRATAMENTO COM ACIBENZOLAR-S-METIL (ASM)**

Atividade de quitinase e peroxidase em folhas de eucalipto com diferentes estágios de desenvolvimento após inoculação com *Puccinia psidii* e tratamento com Acibenzolar-S-metil (ASM)

Leonardo Pires Boava^{1,2}

¹ Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, CEP 18603-970, CP 237, Botucatu, SP ²Bolsita FAPESP e-mail: leoboava@yahoo.com.br

RESUMO

Visando esclarecer os processos bioquímicos durante o processo de infecção no patossistema *Puccinia psidii* x eucalipto foi comparado o metabolismo relacionado à defesa em folhas com diferentes níveis de desenvolvimento, em clone resistente e suscetível à ferrugem determinando a atividade de peroxidase e quitinase. Cada tratamento foi composto de 4 repetições, organizado em delineamento inteiramente casualizado, considerando: 2 clones, inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM) e água destilada; representados pelo 1º par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total), 2º par de folha (2/5 do desenvolvimento total) e 4º par (4/5 do comprimento foliar). A coleta das folhas ocorreu em 4 períodos: 0, 24, 72 e 96 horas após inoculação. Os resultados obtidos evidenciaram que apesar de apresentarem níveis superiores de atividade da quitinase e peroxidase o efeito do Acibenzolar-S-metil (ASM) ou a ação da *P. psidii* não alteraram a expressão dessas atividades em folhas desenvolvidas (4º par) no decorrer do período. Alterações nos níveis da enzima após inoculação apenas puderam ser observadas nas folhas em desenvolvimento (1º e 2º pares), evidenciando que a resposta à infecção foi acompanhada pela síntese de quitinase e peroxidase. Os maiores incrementos nas atividades enzimáticas foram encontrados nas plantas do clone resistente 72 horas após inoculação e nas plantas do clone suscetível

que foram tratadas previamente com o composto Acibenzolar-S-metil (ASM) e posteriormente inoculadas com o patógeno.

ABSTRACT

Chitinase and peroxidase activity in different stages of eucalypt leaves after inoculation with *Puccinia psidii* and Acibenzolar-S-metil

Seeking to explain the biochemical events during the infection process in the pathosystem *Puccinia psidii* x *Eucalyptus* was compared the metabolism related to defence in leaves with different stages of development in resistant and susceptible genotypes, determining the activity of peroxidase and chitinase. Each treatment was composed of 4 replication, organized in a completely randomized design, considering: 2 genotypes, inoculated and non-inoculated with *P. psidii*; sprayed with acibenzolar-S-methyl (ASM) and distilled water; represented by the 1st pair of leaves (with a size equivalent to 1 / 5 of total development leaf) 2nd pair of leaves (2/5 of total development) and 4 par (4/5 length of the leaf). The collection of leaves occurred in 4 seasons: 0, 24, 72 and 96 hours after inoculation. The results showed that despite the present higher levels of activity of chitinase and peroxidase and the effect of Acibenzolar-S-methyl (ASM) or the action of *P. psidii* did not alter the expression of these activities in developed leaves (4th par). Changes in the enzyme levels after inoculation was observed in young leaves (1st and 2nd pairs), showing that the response to infection was accompanied by the chitinase and peroxidase synthesis. The largest increase in the enzyme activities were found in VR 72 hours after inoculation and previously treated with the compound Acibenzolar-S-methyl (ASM).

INTRODUÇÃO

A ferrugem causada por *P. psidii* é uma das principais doenças do eucalipto no Brasil, provocando prejuízos em viveiros e no campo (Alfnas et al., 2004). Levantamentos efetuados em plantios seminais de *Eucalyptus grandis* nas regiões do Vale do Paraíba e sul do Estado de São

Paulo revelaram que 35% das árvores apresentavam ferrugem (*P. psidii*) aos 6 meses de idade. As plantas altamente infectadas tiveram reduções de 25 a 35% em altura e diâmetro quando comparada com as sadias (Takahashi, 2002).

A ferrugem do eucalipto ataca plantas jovens com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros como primórdios foliares, terminais de galhos e haste principal (Figueiredo, 2001). Os estágios de desenvolvimento foliar são muito importantes, pois as folhas são suscetíveis até o estágio 3, ou seja até os 3/5 do seu desenvolvimento em comprimento do limbo (Ruiz, 2007). O fungo *P. psidii* Winter realiza complexas interações biotróficas mediante hifas especializadas e os nutrientes são transportados através de sistemas de membrana especializados (Thordal-Christens, 2003). A primeira linha de defesa de uma planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência do patógeno, que utiliza seus artifícios para penetrar na mesma e causar a infecção. A forma física da cutícula, o número de estômatos e de tricomas por área de epiderme são fatores importantes na definição do nível de resistência a patógenos por algumas espécies vegetais (Agrios, 2005).

A planta ao ser invadida por um patógeno pode desencadear uma série de mecanismos de defesa na tentativa de conter o agente agressor. Após a infecção, pode aumentar o nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça e tiloses (Pascholati & Leite, 1995).

O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias (Sobrinho, 2004). A indução da

resistência pode ser desencadeada pela aplicação de substâncias naturais e/ou sintéticas, por microrganismos inativados e/ou por suas partes (Cavalcanti, 2000).

Visando esclarecer os processos bioquímicos durante o processo de infecção no patossistema *P. psidii* x eucalipto foi comparado o metabolismo relacionado à defesa entre folhas com diferentes estágios de desenvolvimento em plantas resistentes e suscetíveis à ferrugem, após tratamento com o indutor de resistência Acibenzolar-S-metil e inoculação com *P. psidii* determinando a atividade de peroxidase e quitinase.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, tratamento com indutor de resistência e inoculação

Foram utilizadas mudas clonais de sessenta dias de idade, provenientes de híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominados 'Urograndis', gentilmente cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel. De acordo com testes de resistência ao fungo *P. psidii* realizados no Setor de Defesa Fitossanitária/FCA/UNESP-Botucatu-SP, e através de índices de incidência e severidade da doença proveniente de levantamentos realizados pela própria empresa, foram selecionados dois clones de reação resistência/suscetibilidade conhecida. Sendo assim, o clone C0 foi utilizado como padrão de resistência à ferrugem e o clone VR como padrão suscetibilidade.

O indutor de resistência Acibenzolar-S-metil (ASM), produto comercial Bion® 500WG (Syngenta), derivado do benzotriazol, um análogo funcional do ácido salicílico, que tem sido amplamente estudado como agente indutor de resistência, foi pulverizado na dose de 50 ppm. Cinco dias após o tratamento com o indutor as plantas foram inoculadas com *P. psidii*. A obtenção do inóculo consistiu na coleta de uredósporos de *P. psidii* de plantas de eucalipto infectadas naturalmente no campo. A partir dessa coleta foi preparado uma suspensão de 5×10^4 esporos/ mL, em água destilada contendo Tween 80 (0,05%). O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face dorsal das folhas com o auxílio de uma bomba de vácuo, e em seguida as plantas foram mantidas

em câmara de crescimento regulada para 21°C, fotoperíodo de 12 horas e com alta umidade relativa. As amostras de folhas, em diferentes estágios foliares foram coletadas, 0, 24, 72 e 96 horas após a inoculação e encaminhadas para as análises.

Obtenção dos extratos protéicos

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Fisiologia do Parasitismo no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'-USP. Amostras de 0,5 g de folhas de cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em 4 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo 2,56 g de Polivinilpirrolidona (PVP) e Phenylmethanesulfonyl fluoride 5mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 20.000 g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado a -20 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar as atividades de quitinase e peroxidase.

Determinação da atividade de quitinase

A atividade enzimática da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de "CM-chitin-RBV", a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4 mg mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH) (Stangarlin; Pascholati; Labate, 2000). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foi misturado com 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de "CM-chitin-RBV" (2,0 mg mL⁻¹). Após incubação por 20 min. a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g / 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µL de tampão de extração + 200 µL de "CM-chitin-RBV"). A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

Determinação da atividade de peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Luso e Pascholati, 1999). A mistura da reação continha 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹) A concentração de proteínas, expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB, variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

Delineamento experimental

Cada tratamento foi composto de quatro repetições, organizado em delineamento inteiramente casualizado dispostos em esquema fatorial 2x2x2x3x4 considerando 2 clones (moderadamente resistente e suscetível); inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM) e água destilada (H₂O); representados pelo 1º par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total), 2º par de folha (2/5 do desenvolvimento total) e 4º par (4/5 de desenvolvimento). Para as análises estatísticas os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A coleta das folhas foi realizada em quatro diferentes épocas: 0, 24, 72 e 96 horas após inoculação e as amostras foram mantidas em freezer -18°C até o momento da determinação da concentração de proteína e das atividades de peroxidase e quitinase.

RESULTADOS

Atividade de quitinase

Os níveis de atividade de quitinase observados no decorrer do período em folhas do 4º par, em ambos os clones (C0 e VR), foram superiores em todas as condições quando comparadas com as folhas em outros estágios de desenvolvimento (1º e 2º pares) (Figuras 1 A, B, C e D). Entretanto, essas folhas mais desenvolvidas não apresentaram diferença de expressão significativa no nível de atividade da enzima quando foram tratadas com Acibenzolar-S-metil, bem como não apresentaram diferença de expressão nas primeiras 96 horas após inoculação com o patógeno, seja quando tratadas ou não com o indutor de resistência.

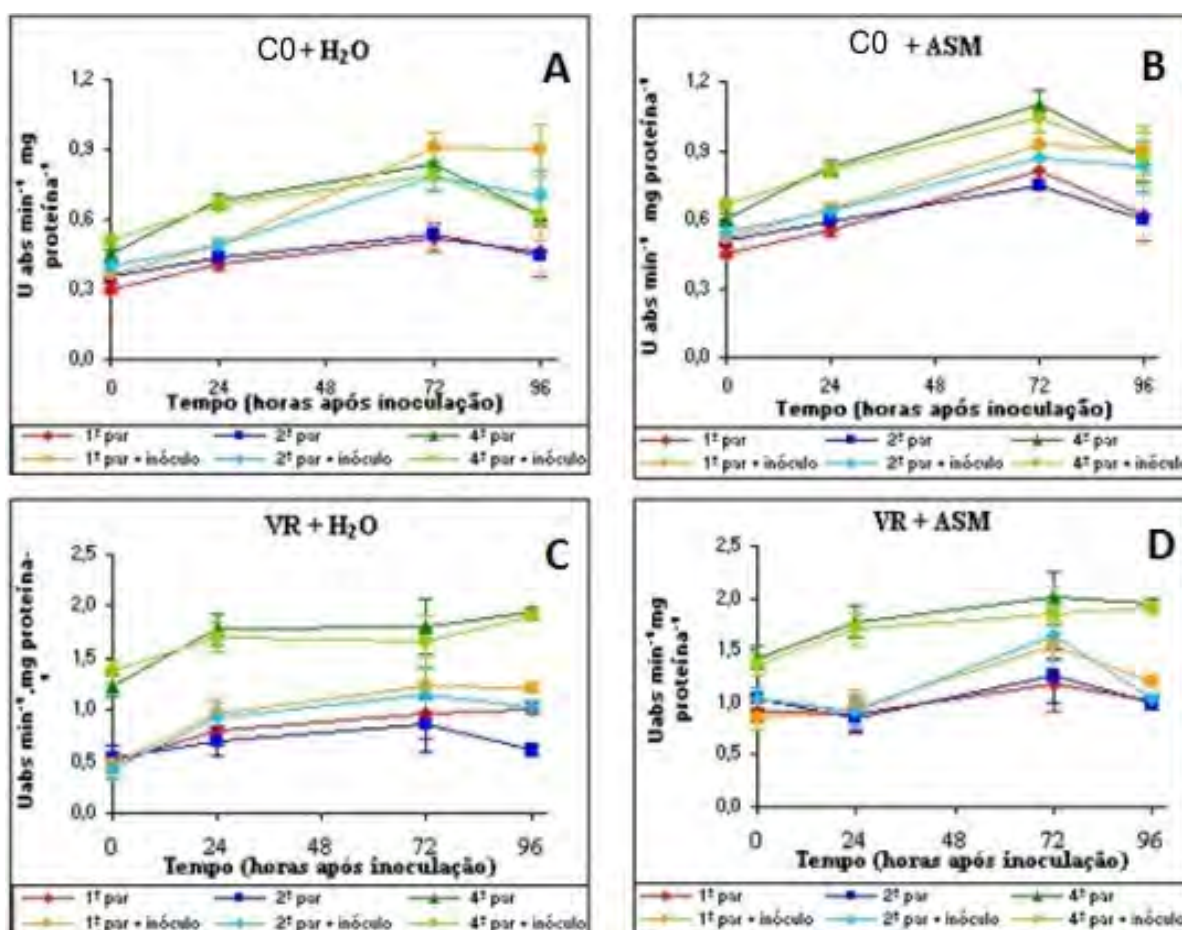


Figura 1. Atividade de quitinase a partir do tecido foliar de *Eucalyptus* representados pelo 1º par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total), 2º par de folha (2/5 do

desenvolvimento total) e 4º par (4/5 do desenvolvimento) em 4 épocas de coleta: 0, 24, 72 e 96 horas após inoculação. A) clone C0 (moderadamente resistente) sem tratamento prévio; B) clone C0 (resistente) tratado com acibenzolar-S-metil (ASM) cinco dias antes da inoculação com *Puccinia psidii*; C) clone VR (suscetível) sem tratamento prévio; D) clone VR (suscetível) tratado com acibenzolar-S-metil (ASM) cinco dias antes da inoculação com *P. psidii*. VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM) e água destilada (H₂O) Barras indicam a média \pm o erro padrão

Alterações na expressão da enzima após inoculação apenas puderam ser observadas em folhas com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento (1º par) ou em folhas equivalente a 2/5 do desenvolvimento total (2º par) (Figura 1). Podendo observar que as plantas de ambos os clones aspergidas com H₂O destilada apresentaram estabilidade nos níveis de atividade da enzima no decorrer do período, e quando inoculadas apresentaram aumento significativo na atividade da enzima 72 horas após inoculação. No entanto, os incrementos na atividade enzimática foram mais acentuados no clone C0 em relação ao clone VR (Figuras 1 A e C).

Nas folhas menos desenvolvidas dos clones VR e C0, o composto Acibenzolar-S-metil contribuiu para um aumento significativo de atividade de quitinase quando comparadas com as plantas testemunhas que não receberam tratamento (Figuras 1 B e D). Além disso, as plantas de ambos os clones também apresentaram um aumento de atividade da enzima quando foram tratadas previamente com o composto Acibenzolar-S-metil e posteriormente inoculadas com o patógeno. Contudo esse aumento foi mais expressivo na plantas do clone VR.

Atividade de peroxidase

As folhas desenvolvidas (4º par) pertencente aos clones C0 e VR apresentaram atividade de peroxidase superior em todas as condições quando comparadas com as folhas em outros estágios de desenvolvimento (1º e 2º pares). No entanto a atividade da enzima não apresentou diferença de expressão significativa quando foram tratadas com indutor de resistência Acibenzolar-S-metil ou após serem inoculadas com o patógeno. Alterações nos níveis da enzima após inoculação ou após

tratamento com Acibenzolar-S-metil (ASM) apenas puderam ser observadas em folhas com tamanho menos desenvolvidas (Figuras 2 A, B, C e D).

As folhas menos desenvolvidas das plantas de ambos os clones aspergidas com água destilada, apresentaram estabilidade nos níveis de atividade da enzima no decorrer do período, e quando inoculadas apresentaram aumento significativo na atividade da enzima 72 horas após inoculação, sendo esse aumento mais acentuado no clone C0 do que no clone VR (Figura 2 A e C).

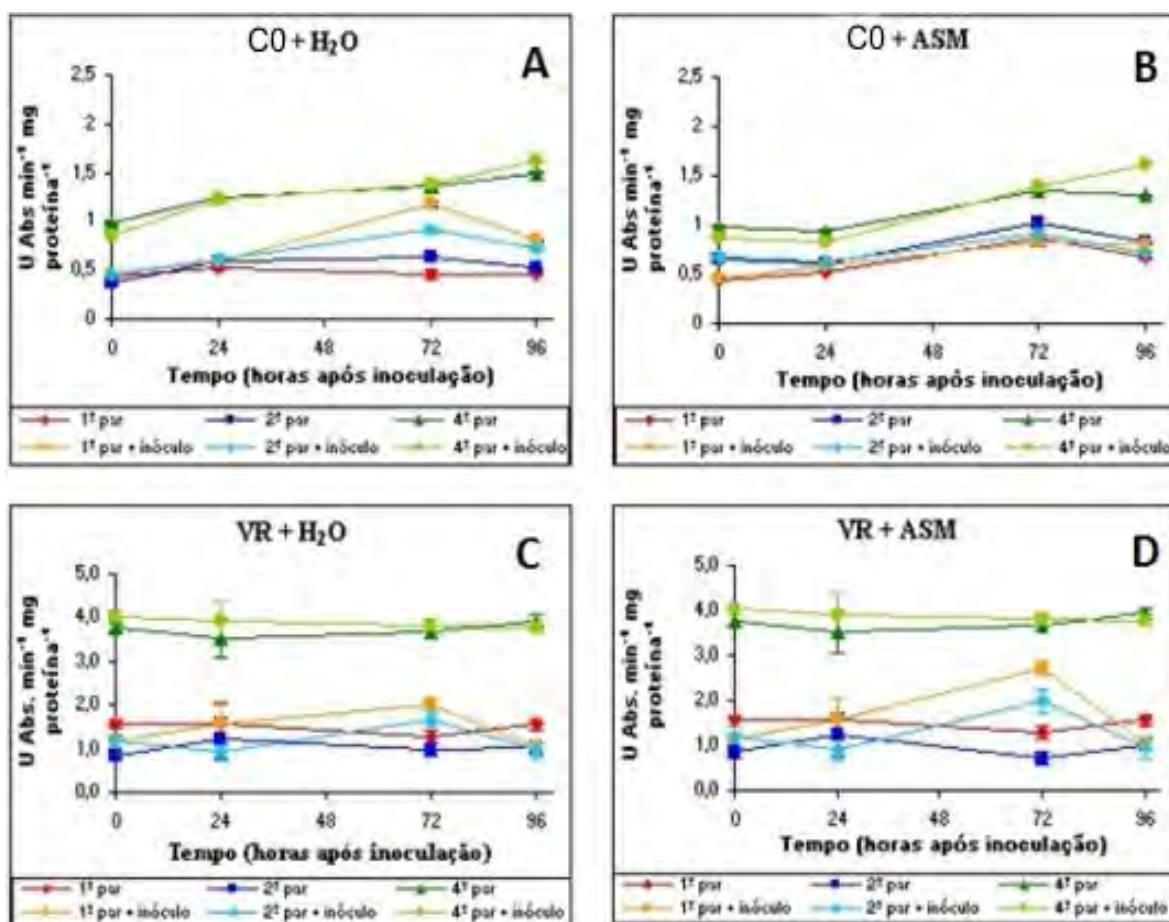


Figura 2. Atividade de peroxidase a partir do tecido foliar de *Eucalyptus* representados pelo 1^o par de folha (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total) 2^o par de folha (2/5 do desenvolvimento total) e 4^o par (4/5 de desenvolvimento) em 4 épocas de coleta: 0, 24, 72 e 96 horas após inoculação. A) clone C0 (moderadamente resistente) sem tratamento prévio; B) clone C0 (moderadamente resistente) tratado com acibenzolar-S-metil (ASM) cinco dias antes da inoculação

com *P. psidii*; C) clone VR (suscetível) sem tratamento prévio; D) clone VR (suscetível) tratado com acibenzolar-S-metil (ASM) cinco dias antes da inoculação com *Puccinia psidii*. VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM) e água destilada (H₂O) Barras indicam a média \pm o erro padrão

O composto Acibenzolar-S-metil (ASM) não contribuiu para um aumento significativo de atividade de peroxidase para ambos os clones quando comparadas com as plantas testemunhas que não receberam tratamento (Figuras 2 B e D). No entanto o clone VR quando as plantas estavam previamente tratadas com o indutor e foram inoculadas se observou um aumento de atividade da enzima 72 horas após inoculação (Figura 2 D), por outro lado o clone C0 tratado com o Acibenzolar-S-metil (ASM) não manifestou alteração após inoculação (Figura 2 B).

DISCUSSÃO

Estudos recentes têm mostrado que a super expressão de genes de quitinases em plantas, tem aumentado a resistência dessas plantas a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componentes principais das paredes celular dos fungos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (Van Loon et al., 2006). A enzima peroxidase está diretamente ligada à lignificação dos tecidos, a qual polimeriza lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos (Pascholati & Leite 1995). Os mesmos autores argumentam que a lignificação e seus precursores tóxicos exercem papel importante na relação de resistência em plantas de batata infectadas por *P. infestans*. A atividade da peroxidase, na maioria dos casos, aumenta sob condições de diferentes situações de estresse, provocada por ferimentos, infecções por fungos, salinidade, deficiência hídrica, deficiência nutricional, dentre outros, levando também ao acréscimo na produção de lignina e etileno (Schallenberger 1994).

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram que as folhas de estágio mais avançado (4º par) apresentaram níveis superiores de atividade da quitinase e peroxidase no

decorrer do período. Alterações nos níveis da enzima após inoculação apenas puderam ser observadas nas folhas com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento (1º par) ou em folhas equivalente a 2/5 do desenvolvimento total (2º par), evidenciando que a resposta à infecção foi acompanhada tanto pela síntese de quitinase e peroxidase, como pelo aumento de expressão nos tecidos menos desenvolvidos. Tal fato está relacionado com resultados apresentados por alguns autores, demonstrando presença de sintomas de ferrugem apenas nas folhas mais novas de eucalipto. Segundo Figueredo (2001), a ferrugem do eucalipto só ataca plantas jovens com menos de dois anos de idade, sempre em órgãos tenros como primórdios foliares. Para Santos (2001) a doença afeta os tecidos mais jovens da parte aérea das plantas, especialmente de mudas jovens, causando a morte do ápice.

Assumindo a possibilidade de que a expressão das enzimas esteja correlacionada com a penetração do fungo, sugerindo a participação dessas enzimas no mecanismo de defesa das plantas, fica evidente que as folhas mais desenvolvidas não sofreram uma ação direta do patógeno. Visto que a primeira linha de defesa de uma planta contra agentes invasores é a sua superfície, onde ocorre a aderência do patógeno, que utiliza seus artifícios para penetrar na mesma e causar a infecção (Agrios, 2005). O nível de sucesso dos patógenos em atravessar a primeira barreira de defesa depende do grau de co-evolução da relação patógeno-hospedeiro (Thordal-Christensen, 2003).

Em vista disso, vale ressaltar que a combinação de características estruturais dos tecidos e reações bioquímicas empregadas nos processos de defesa das plantas são essenciais para a sua manutenção no ecossistema, em função das adversidades e invasões a que estão submetidas. Assim, o estudo das estruturas anatômicas pré-formadas da planta é de fundamental importância para uma melhor compreensão desses processos e dos mecanismos envolvidos na resistência aos patógenos (Souza, 2008). A composição química, a quantidade e a forma física das ceras epicuticulares de folhas são governadas por muitos fatores, variando entre espécies (Baker & Hunt, 1981). Dessa forma, a consideração da cutícula como estrutura de resistência deve ser analisada com prudência, visto que tal capacidade depende das características desta e do agente de inter-relação (Silva et al, 2005). Fatores

esses que podem ter sido determinantes para evitar a penetração do patógeno nos tecidos mais desenvolvidos, evidenciado pela não diferenciação de expressão das atividades enzimáticas quando a planta fora desafiada pelo patógeno.

Souza (2008) quantificou os caracteres anatômicos foliares do eucalipto, e estudou a micromorfologia de folha em três estágios de desenvolvimento de clones resistentes e suscetíveis a fim de relacionar esses fatores com a resistência à ferrugem, causada pelo fungo *P. psidii*. No estudo foram encontradas diferenças estruturais entre os clones e entre os níveis de desenvolvimento das folhas. O clone resistente e as folhas mais desenvolvidas apresentaram maior espessura das cutículas abaxial e adaxial, maior espessura do parênquima paliçádico adaxial, maior % de parênquima paliçádico, maior número e área de cavidades oleíferas, menor espessura da epiderme abaxial e menor espessura e % de parênquima lacunoso. Segundo a autora, esses parâmetros podem dificultar a penetração do patógeno e a sua colonização nos tecidos do hospedeiro.

Com base nos resultados obtidos nas amostras das folhas menos desenvolvidas, constatou-se que as plantas de ambos os clones aspergidas com H₂O destilada apresentaram estabilidade nos níveis de atividade das enzimas no decorrer do período, e quando inoculadas apresentaram aumento significativo na atividade das enzimas até 72 horas após inoculação. Os incrementos na atividade enzimática apresentaram uma taxa constante para a quitinase no 1º e 2º par de folha no clone C0, enquanto que no clone VR a taxa foi maior e mais constante.

Com relação à eficiência do indutor de resistência foi visto que o composto Acibenzolar-S-metil (ASM) contribuiu para o aumento da atividade de peroxidase apenas nas folhas em desenvolvimento do clone VR inoculadas. Quanto a atividade da quitinase foi aumentada quando comparada com as plantas que não receberam tratamento, porém de maneira diferenciada entre os clones, pois no C0 aumentou mais acentuadamente nas folhas mais velhas (2º e 4º par) e no VR nas folhas mais novas (1º e 2º par). Resultados semelhantes foram apresentados por Sobrinho (2004) no patossistema Caupi-*Macrophomina phaseolina* onde a atividade da enzima quitinase mostrou-se

efetivamente aumentada nos tratamentos com o produto. O aumento da atividade da enzima pode estar ligado à capacidade do Acibenzolar-S-metil (ASM) em ativar mecanismo de defesa da planta. Essa indução anteciparia prováveis reações bioquímicas de defesa que só seriam ativadas, por exemplo, com o ataque de um patógeno. O aumento da atividade da quitinase seria resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram estresse (Gaspar et al., 1985), no caso a aplicação do indutor. Com isso, a planta provavelmente estaria em condições de mostrar resistência contra patógenos aos quais normalmente seria suscetível.

As folhas menos desenvolvidas de ambos os clones também apresentaram um aumento de atividade das enzimas quando as plantas foram tratadas previamente com o composto Acibenzolar-S-metil (ASM) e posteriormente inoculadas com o patógeno. Esse aumento foi mais expressivo na plantas do clone VR evidenciando que esse mecanismo foi acionado, apresentando maior expressão a partir do desafio com o patógeno em plantas pré-condicionadas pelo efeito do ASM. O pré-condicionamento é um importante componente da resistência sistêmica induzida e está associado ao aumento da capacidade para uma rápida e efetiva ativação das respostas de defesa celular, as quais são induzidas somente após o contato com o patógeno desafiante (Conrath; 2002). Quando a planta é induzida pela presença de um elicitor, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada à uma planta induzida com o mesmo elicitor e posteriormente desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno (Kuhn, 2007).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati por permitir a realização desse trabalho no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de plantas do setor de fitopatologia da ESALQ-USP , à toda a equipe do laboratório em especial ao Dr Odair José Kuhn

À equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel (VCP), por cederem material contrastante para este estudo, nas pessoas de Cezar Bonine, Donizete C. Dias.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G.N. Plant Pathology. San Diego: Academic Press, 2005, p. 208-248
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto, Viçosa, UFV, 2004. 442p
- BAKER, E.A. & HUNT, G.M. 1981. Developmental changes in leaf epicuticular waxes in relation to foliar penetration. *New Phytol.* 88: 731-747.
- CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. Em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM). Lavras, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Lavras
- CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant science*, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002
- FIGUEIREDO, M.B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. *Biológico*, São Paulo, v.63, n.1, p.29-32, 2001
- GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H.A. Two step control of basic and acidic peroxidase and significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, v.64, p.418-423, 1985
- KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção Tese

- (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2007
- LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.25, p. 244-249, 1999
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 22, p. 417-453
- SANTOS, A.F.; AUER, S.G.; GRICOLETTI JR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Circular técnica 45, EMBRAPA Floretas, 1ªed, 19p, 2001
- SCHALLENBERGER, E.. Fatores que predispõem as plantas cítricas ao ataque de coleobrocas. Botucatu. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura), Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, 1994.
- SILVA, L.M.; ALQUINI, Y. e CAVALLET, V.J. Inter-relações entre a anatomia vegetal ea produção vegetal. *Acta Botanica Brasilica*. v.19, n.1, p.183-194. 2005
- SILVEIRA, R. L.V.A.; HIGASHI, E.N..: Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para a ferrugem (*P. psidii*) do eucalipto CIRCULAR TÉCNICA IPEF n. 200, p. 01-13, dezembro de 2003
- SOBRINHO.A.C. Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno Tese (Doutorado Fitopatologia)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004
- SOUZA, R. R. S. Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Planta) Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho- UNESP- Botucatu, 104 p. 2008

- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 6, n. 4, p.351-357, 2003
- VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-62. 2006.

CAPÍTULO III

EFEITO DE ACIBENZOLAR-S-METIL (ASM) E *Saccharomyces cerevisiae* NA ATIVAÇÃO DE DEFESAS DO EUCALIPTO CONTRA A FERRUGEM

Efeito de Acibenzolar-S-metil (ASM) e *Saccharomyces cerevisiae* na ativação de defesas do eucalipto contra a ferrugem

Leonardo P. Boava^{1,3}

¹ Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, CEP 18603-970, CP 237, Botucatu, SP, ³ Bolsita FAPESP, e-mail: leoboava@yahoo.com.br

RESUMO

Visando elucidar os mecanismos de defesa do eucalipto contra o fungo *Puccinia psidii*, o presente trabalho procurou avaliar o potencial dos indutores acibenzolar-S-metil e levedura *Saccharomyces cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência. No presente trabalho procurou-se correlacionar a aplicação de indutores da resistência com possíveis alterações bioquímicas na planta, dosadas a partir da atividade das enzimas: quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase. Para isso, mudas de eucalipto híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (Urograndis) denominados VR (classificado como suscetível à ferrugem) e C0 (classificado como moderadamente resistente) foram mantidas em casa de vegetação e aplicou-se os tratamentos com Acibenzolar-S-metil e *S. cerevisiae* cinco dias antes da inoculação com o patógeno. A inoculação foi realizada na face dorsal das folhas e a avaliação se deu 15 dias após a inoculação estimando-se por meio de uma escala de notas (S0, S1, S2 e S3). Os tratamentos com Acibenzolar-S-metil (ASM) e *S. cerevisiae* (S.c) se mostraram eficiente para o controle da ferrugem em plantas de ambos os clones, que tiveram ausência de pústulas (imunidade). Foi verificada diferença de atividade

enzimática, com exceção da polifenoloxidase, em ambos os clones, seja pela ação do patógeno, pelo efeito dos indutores de resistência ou ainda pela interação entre indutor-patógeno, coincidindo com a redução da doença proporcionada pela ação dos indutores.

ABSTRACT

Effect of ASM and *Saccharomyces cerevisiae* in defence activation of eucalypt against rust

For the elucidation of the mechanisms of protection against fungus *Puccinia psidii* of *Eucalyptus*, this study aimed to evaluate the potential of inducing acibenzolar-S-methyl and yeast *Saccharomyces cerevisiae* in activation of mechanisms of resistance. In this study sought to correlate the implementation of inducers of resistance with possible biochemical expressions of defense of the plant, determined from the activity of enzymes: chitinase, peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase and polyphenoloxidase. For this, plant of two different clones were kept in a greenhouse and applied to the treatments with Acibenzolar-S-methyl and *S. cerevisiae* five days before the inoculation with the pathogen. The inoculation was held back in the face of the leaves and evaluation was given 15 days after inoculation estimated by means of a scale of notes (S0, S1, S2 and S3). The treatments with Acibenzolar-S-methyl (ASM) and *S. cerevisiae* (Sc) were effective for control of rust in plants of both clones, which had no pustules (immunity). It was observed difference in enzyme activity in both clones, either by the action of the pathogen, the effect of inducing or even of resistance by the interaction between pathogen-inducer, coinciding with the reduction of the disease provided by the action of inducers.

INTRODUÇÃO

O eucalipto é suscetível a uma série de doenças, na sua maioria, provocada por

fungos patogênicos desde a fase de viveiro até os plantios adultos (Alfenas et al., 2001). Dentre essas, a ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter tem sido limitante ao estabelecimento de novos plantios e à condução por rebrota de materiais suscetíveis, após o corte raso. Além disso, esta doença tem ocorrido em mini-jardins clonais destinados à produção de brotos para miniestaquia e tem afetado a multiplicação clonal do eucalipto (Teixeira, 2004).

A resistência genética é apontada como a melhor opção para o controle da ferrugem do eucalipto, devido à existência de variabilidade no grau de resistência, tanto entre espécies de *Eucalyptus*, quanto entre procedências de uma mesma espécie (Santos et al., 2001). A resistência pode também ser ativada em plantas suscetíveis após a infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como 'indução de resistência' (Hammerschmidt & Dann 1997). O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes causais de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias (Sobrinho, 2004).

Dentre os indutores abióticos, o ácido salicílico (AS) e seus análogos funcionais são os mais importantes (Silva, 2007). O composto sintético éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil, ASM, BTH, CGA, Bion®, Actigard®), derivado do benzotiadiazol, é um análogo funcional do ácido salicílico e tem sido amplamente estudado como agente indutor da RSA (Mazaro, 2007). Os agentes bióticos, sejam estes microrganismos viáveis ou inativados, podem também ativar mecanismos de defesa da planta (Stangarlin & Pascholati, 1994). Segundo Cardoso Filho (2003) inúmeros trabalhos

evidenciam o potencial da levedura *S. cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência e na proteção de plantas contra fitopatógenos. Recentemente, o grupo de pesquisas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica do setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ) demonstrou o efeito de suspensões de células dessa levedura (linhagem de panificação), bem como do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas contra doenças.

A indução de resistência ocorre pela ativação de genes que codificam uma série de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e enzimas envolvidas na síntese de fitoalexinas e lignina. A detecção e quantificação da expressão dessas enzimas seria uma das formas de separar o efeito indutor de resistência do efeito tóxico direto de determinado produto (Resende et al., 2002). As proteínas-RP englobam famílias de proteínas com características variadas (quitinases, β -1,3-glucanases, lisozimas, peroxidases, osmotinas, dentre outras), mas com o fato em comum de estarem todas relacionadas aos processos de defesa durante a patogênese, apresentando dessa forma, potencial para serem exploradas nos programas de indução de proteção em plantas (Van Loon & Van Strien, 1999). As enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e polifenoloxidase estão envolvidas na rota biossintética dos fenilpropanóides, sendo que a FAL é produtora de compostos fenólicos como flavonóides, fitoalexinas, ligninas e derivados do ácido benzóico (Sarma et al., 1998).

Diante do exposto, no presente trabalho procurou-se avaliar o potencial dos indutores acibenzolar-S-metil e levedura *S. cerevisiae* quanto à capacidade em alterar o metabolismo das plantas de eucalipto, com base na atividade das enzimas quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase, visando a redução dos sintomas causados por *P. psidii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e manutenção das plantas e tratamento com indutores de resistência

O cultivo e manutenção das plantas de eucalipto se deram no setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP-Botucatu. As mudas foram mantidas em vasos em casa de vegetação climatizada. Foram utilizadas mudas de eucalipto híbridos das espécies *E. grandis* x *E. urophylla* (Urograndis) denominados VR (classificado como suscetível à ferrugem) e C0 (classificado como moderadamente resistente), gentilmente cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel.

O composto Acibenzolar-S-metil (ASM), produto comercial Bion® 500WG (Syngenta) foi utilizado no experimento na dosagem de 50 ppm. A levedura *S. cerevisiae* foi obtida a partir fermento biológico Fleischmann® submetido a quatro autoclavagens de uma hora cada a 121 °C a 1 atm e entre os intervalos de autoclavagem, a suspensão foi retirada e resfriada em gelo por 20 minutos. Após as quatro autoclavagens a suspensão ficou em descanso por 2 horas para decantação, onde foi utilizado o sobrenadante. A aplicação nas plantas foi efetuada na dose de 200 mg/L.

Obtenção e manutenção do patógeno e método de inoculação

A obtenção do inóculo consistiu na coleta de uredósporos de *P. psidii* de plantas de eucalipto infectadas naturalmente no campo. A partir dessa coleta foi preparado uma suspensão de 5×10^4 esporos/ mL, em água destilada contendo Tween 80 (0,05%). O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face dorsal das folhas com o auxílio de uma bomba de vácuo. Em seguida, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento

regulada para 21°C, fotoperíodo de 12 horas e com alta umidade relativa. A inoculação se deu cinco dias após os tratamentos com os indutores de resistência (Acibenzolar-S-metil e *S. cerevisiae*).

A avaliação da doença foi realizada 15 dias após a inoculação, estimando-se por meio de uma escala de notas o tipo de reação à infecção, proposta por Aparecido et al. (2003), onde: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade; S1 = poucas pústulas sem esporulação; S2 = muitas pústulas, com esporulação; e S3 = muitas pústulas com grande esporulação.

Determinação das atividades enzimáticas

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Fisiologia do Parasitismo no setor de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP. As amostras foram representadas pelo 1º par de folhas (com tamanho equivalente a 1/5 do desenvolvimento foliar total) e pelo 2º par de folhas (2/5 do desenvolvimento total). Após a coleta as amostras foram mantidas em congelador –18 °C para posterior obtenção do extrato protéico.

Amostras de 0,5 g de folhas correspondendo a cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida homogeneizadas em 4 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo 2,56 g de Polivinilpirrolidona (PVP) e Phenylmethanesulfonyl fluoride 5mM (PMSF). Os extratos foram centrifugados a 20.000 g por 25 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado a -20°C. Os sobrenadantes foram utilizados para se avaliar as atividades de quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidasas.

A atividade da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de “CM-chitin-RBV”, a partir de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Quitin-RBV 4 mg mL⁻¹, Loewe Biochemica GmbH) (Stangarlin, et al., 2000). Para tanto, 200 µL do extrato protéico foi misturado com 600 µL do mesmo tampão de extração e 200 µL de “CM-chitin-RBV” (2,0 mg mL⁻¹). Após incubação por 20 minutos a 40°C, a reação foi paralisada com a adição de 200 µL de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo e centrifugação a 10.000g / 5 min. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 µL de tampão de extração + 200 µL de “CM-chitin-RBV”). A concentração de proteínas expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL⁻¹), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 µg mL⁻¹.

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (Luzzo & Pascholati, 1999). A mistura da reação continha 0,10 mL do extrato protéico e 2,9 mL de solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0). A cubeta de referência continha 3 mL da solução com 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorbância.min⁻¹.mg proteína⁻¹). A concentração de proteínas expressa em termos de equivalentes µg de albumina de soro bovino (ASB) em um mL de amostra (µg proteína mL⁻¹),

foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade da FAL foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (Umesha, 2006). A mistura da reação, incubada a 40°C por 2 h, continha 100 μl do extrato protéico, 400 μL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μl de L-fenilalanina (50 mM em tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8). A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, contra tampão de extração, sendo subtraído de cada amostra o valor do controle. O controle correspondia a uma mistura contendo 100 μL do extrato protéico e 900 μL de tampão Tris HCl 25 mM, pH 8,8. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico e a atividade enzimática expressa em μg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade das polifenoloxidasas foi determinada usando-se a metodologia de Duangmal e Apenten (1999). O ensaio consistiu em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta mediada pela enzima em estudo. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). A reação se desenvolveu em 900 μL do substrato e 100 μL do extrato enzimático. A temperatura de reação foi de 30 °C e as leituras em espectrofotômetro, a 420 nm, foram realizadas de forma direta por um período de 2 min. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em $\text{absorbância} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

Delineamento experimental

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições onde cada planta representou uma repetição. Foi disposto em esquema

fatorial 2x2x3x5, considerando 2 clones (C0 e VR); inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *S.cerevisiae* (S.c) e água destilada (H₂O) e imediatamente após a inoculação se iniciou a coleta das folhas em 5 diferentes períodos: 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Para as análises estatísticas os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos indutores na severidade da doença

De acordo com a escala de notas utilizada para severidade da doença como observado na Tabela 1, os clones C0 e VR quando não receberam tratamento prévio com algum indutor de resistência foram classificados com S1 (poucas pústulas sem esporulação) e S2 (muitas pústulas, com esporulação). Entretanto, os tratamentos com Acibenzolar-S-metil e *S. cerevisiae* (S.c) se mostraram eficientes para o controle da ferrugem em plantas de ambos os clones, de modo que foram classificados, quanto ao tipo de infecção como S0 (ausência de pústulas, imunidade).

Tabela 1. Efeito de indutores de resistência bióticos e abióticos na redução do sintomas de *Puccinia psidii* em eucalipto baseados na escala de notas proposta por Aparecido et al. (2003)

Tratamento	Escala de notas	Tratamento	Escala de notas
C0 + H ₂ O	S0	VR + H ₂ O	S0
C0 + ASM	S0	VR + ASM	S0
C0 + S.c	S0	VR + S.c	S0
C0 + H ₂ O + Inóculo	S1	VR + H ₂ O + Inóculo	S2
C0 + ASM + Inóculo	S0	VR + ASM + Inóculo	S0
C0 + S.c + Inóculo	S0	VR + S.c + Inóculo	S0

S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade; S1 = poucas pústulas sem esporulação; S2 = muitas pústulas, com esporulação; e S3 = muitas pústulas com grande esporulação.

O ASM tem se mostrado experimentalmente capaz de induzir resistência contra algumas doenças onde medidas eficazes de controle são raras ou mesmo ausentes, como a podridão radicular em tomateiro causada por *Fuarium oxysporum f. sp. radicis-itycopersici* (Benhamou & Belanger, 1998) e a virose provocada pelo Cucumber mosaic vírus. Guzzo et al. (2001) verificaram o efeito acibenzolar-S-metil em cafeeiro suscetível a *Hemileia vastatrix* e observaram indução de proteção nas plantas. Os mesmos autores observaram ainda, pela microscopia de fluorescência, que o ASM aplicado *in vivo* não interfere na germinação dos esporos e na formação de apressórios de *H. vastatrix*, concluindo assim, que o ASM não possui ação antimicrobiana direta aos patógenos, mas induz a expressão de genes de resistência para a formação de compostos que impedem ou dificultam o estabelecimento ou desenvolvimento destes patógenos.

Diversos trabalhos têm demonstrado o efeito de suspensões de células de *S. cerevisiae* (linhagem de panificação), bem como do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas de sorgo contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum*, em milho contra *C.graminicola* e *E. turcicum*, maracujá contra *Xanthomonas campestris* pv. Passifora, eucalipto contra *Botrytis cinerea* (Lopez, 1991; Piccinin, 1995; Silva & Pascholati, 1992; Stangarlin & Pascholati, 1994; Piccinin, 1995 citados por Cardoso Filho).

É muito provável que a resistência induzida por *S. cerevisiae* esteja ligada à presença de determinados carboidratos e glicoproteínas presentes em sua parede celular (Wulff & Pascholati, 1999). De acordo com Labanca (2002), a parede da levedura é formada basicamente por polissacarídeos e proteínas, com a seguinte distribuição aproximada em peso: 50 % β -1,3-glucanas, 10 % β -1,6- glucanas, 40 % manoproteínas e 1-3 % quitina. A autoclavagem de células de *S. cerevisiae* leva a liberação de diversos polímeros e oligômeros

com massa molecular, carga e conteúdo de açúcares e de proteínas bastante variável. Wulff & Pascholati (1999) extraíram desse modo uma glicoproteína carregada negativamente (em pH 8), cuja porção protéica é importante para a indução da síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo.

Atividade de quitinase

Constatou-se que as plantas dos clones C0 e VR (moderada resistência e suscetível, respectivamente) pulverizadas com H₂O destilada apresentaram estabilidade nos níveis de atividade da quitinase no decorrer do tempo, e após inoculação apresentaram aumento na atividade da enzima (Figura 1A e B). No entanto, esse incremento se diferiu na intensidade e no tempo de expressão comparando os dois clones. O clone VR apresentou elevação de atividade da enzima 24 horas após inoculação (Figura 1B) e o clone C0 só manifestou esse incremento 48 horas após inoculação, mas de uma forma mais intensa (Figura 1A). De acordo com Ryals (1996) citado por Junqueira (2003) a rapidez e/ou intensidade com que a reação de defesa ocorre, determinará resistência ou não ao patógeno. Assim durante o curso da interação entre os clones e o patógeno, efetivas isomorfias dessas enzimas podem não ser produzidas em quantidade suficiente, tempo e local correto, o que justificaria a maior severidade da doença nas plantas do clone VR em relação ao clone C0 que não receberam tratamento com indutor de resistência. Estudos recentes têm mostrado que a super expressão de genes de quitinases em plantas, tem aumentado a resistência dessas plantas a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componentes principais das paredes celular dos fungos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (Van Loon et.al.2006).

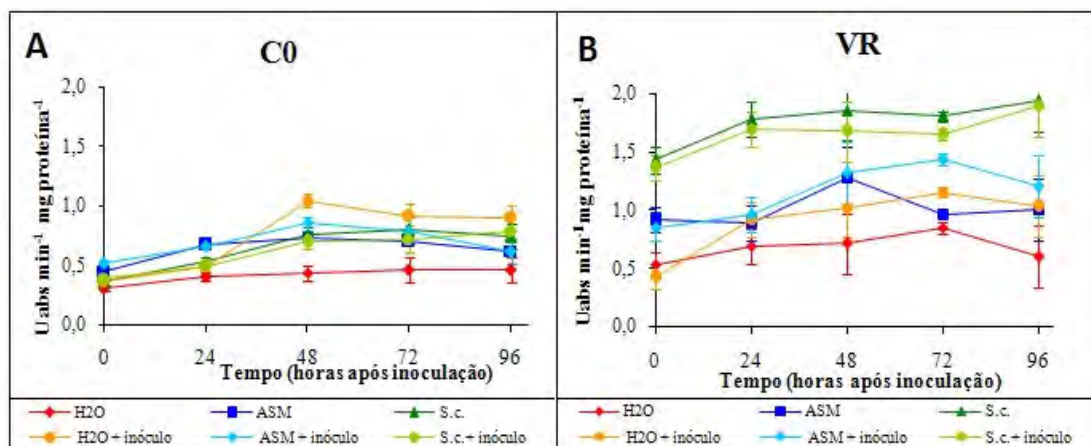


Figura 1. Atividade de quitinase a partir de tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderada resistência) e VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *Puccinia psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) e água destilada (H₂O) 5 dias antes inoculação, coletados em 5 períodos: 0, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação.

As plantas de ambos os clones que receberam tratamento com Acibenzolar-S-metil ou com *S. cerevisiae* apresentaram diferença significativa na expressão de atividade da enzima, quando comparado com a testemunha pulverizada com água mesmo nas plantas não inoculadas (Figura 1A e B). Na figura 1B é possível observar também que as plantas do clone VR que receberam tratamento com indutor *S. cerevisiae* (S.c) apresentaram níveis de atividade significativamente mais acentuados, comparado a todas as outras situações independentemente da presença ou ausência do patógeno.

O aumento da atividade da enzima pode estar ligado à capacidade do Acibenzolar-S-metil e da levedura *S. cerevisiae* em ativar mecanismo de defesa da planta. Essa indução anteciparia prováveis reações bioquímicas de defesa que só seriam ativadas, por exemplo, com o ataque de um patógeno. O aumento da atividade da quitinase seria resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram estresse (Gaspar et

al., 1985), no caso a aplicação dos indutores. Com isso, a planta provavelmente estaria em condições de mostrar resistência contra patógenos aos quais normalmente seria suscetível.

Resultados semelhantes na elevação de atividade de quitinase em decorrência da aplicação de ASM ou de *S. cerevisiae* têm sido evidenciados por muitos autores. Guzzo (2004) demonstrou elevação da atividade da enzima em plantas de café que foram tratadas com ASM a partir do segundo dia da aplicação, e o aumento local e sistêmico de atividade pode ser observado até 35 dias após a aplicação do indutor. Roncatto, (1997) evidenciaram que as preparações da levedura *S. cerevisiae*, tratadas termicamente ou não, ocasionaram aumentos na atividade dessas enzimas hidrolíticas presentes em folhas de milho.

Em relação às plantas tratadas com os indutores e posteriormente desafiadas pelo patógeno foi possível observar que as plantas do clone C0 previamente tratadas com Acibenzolar-S-metil ou *S. cerevisiae* não apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão de atividade de quitinase após a inoculação com *P. psidii* (Figura 1A). O indutor *S. cerevisiae* quando aplicado nas plantas do clone VR também não induziu diferença de expressão na atividade da enzima após inoculação (Figura 1B). No entanto as plantas previamente tratadas com Acibenzolar-S-metil apresentaram elevação de atividade 72 horas após inoculação com o patógeno (Figura 1B), evidenciando que esse mecanismo foi acionado, apresentando um aumento de expressão a partir do desafio com o patógeno em plantas pré-condicionadas pelo efeito do Acibenzolar-S-metil. Segundo Kuhn (2007), quando comparada uma planta induzida com um elicitor e posteriormente desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, evidenciando-se que a planta está mais capacitada para responder à presença do patógeno.

Atividade de peroxidase

As plantas do clone C0 como as do clone VR, pulverizadas com H₂O destilada, apresentaram estabilidade nos níveis de atividade da peroxidase no decorrer do tempo, e com a presença do patógeno ocorreu aumento significativo 48 horas após inoculação (Figura 2A e B), no entanto esse aumento de atividade foi mais expressivo no clone VR (Figura 2B). Contrariando os resultados apresentados por Shimono et al. (1991) onde após a infecção, a atividade da peroxidase foi maior em cultivares de milho resistente a infecção por *Exserohilum turcicum*, do que naqueles suscetíveis.

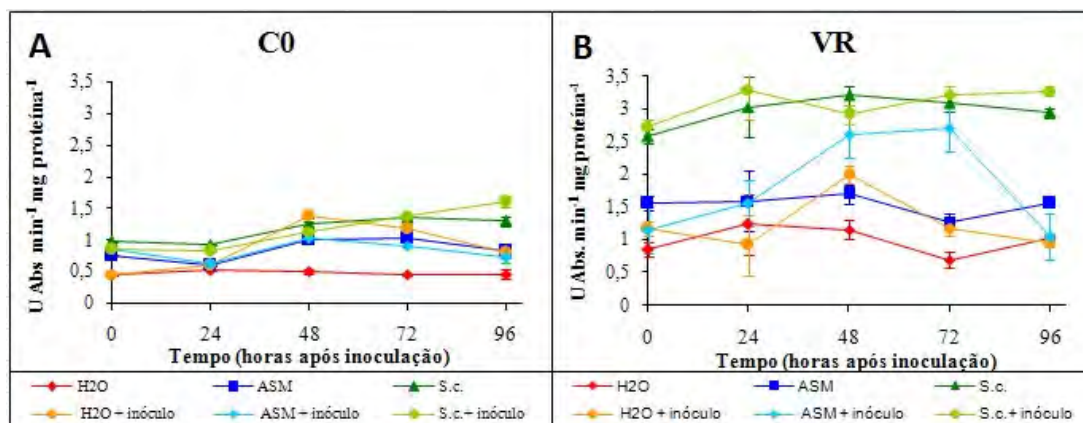


Figura 2. Atividade de peroxidase a partir de tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (suscetível), inoculados e não inoculados com *Puccinia psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) e água destilada (H₂O) 5 dias antes da inoculação, coletados em 5 períodos: 0, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação.

Segundo Asada (1992) a atividade dessa enzima pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade de diferentes hospedeiros e na presença de diferentes patógenos. A enzima peroxidase está diretamente ligada à lignificação dos tecidos a qual polimeriza lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos (Pascholati & Leite 1995). Os mesmos autores argumentam que a lignificação e seus precursores tóxicos exercem

papel importante na relação de resistência em plantas de batata infectadas por *P. infestans*. A atividade da peroxidase, na maioria dos casos, aumenta sob condições de diferentes situações de estresse, provocada por ferimentos, infecções por fungos, salinidade, déficit hídrico, déficit nutricional, dentre outros, levando também ao acréscimo na produção de lignina e etileno (Schallenberger 1994). Contudo, a resposta na atividade da referida enzima pode apresentar-se variável, o que de certa forma fomenta a discussão quanto ao seu real papel nos processos de resistência (Moerschbacher 1992). Sua ação poderia ainda ocorrer indiretamente, através de produtos de sua atividade, tóxicos ao patógeno ou induzindo a formação de barreiras estruturais.

Na comparação entre os tratamentos com os indutores, as plantas dos clones C0 e VR, apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima, comparada com a testemunha pulverizada com água (Figura 2A e B), no entanto esse aumento de atividade foi mais acentuado no clone VR principalmente quando tratadas com *S. cerevisiae* (Figura 2B). Roncatto e Pascolatti (1998) sugeriram que as alterações ocorridas com a peroxidase em plantas de milho e sorgo em resposta ao tratamento com *S. cerevisiae* (S.c), refletiam o “reconhecimento” da levedura pelas células vegetais, acarretando uma alteração do metabolismo normal da planta. A indução da atividade de peroxidases, pelo Acibenzolar-S-metil, foi também relatada por Cavalcanti (2000) em cacau contra *Verticillium dahliae* Kleb. sendo detectada em um nível mais alto por período de tempo mais longo. O aumento da atividade da peroxidase seria resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram estresse (Gaspar et al., 1985), no caso a aplicação dos indutores.

As plantas do clone C0 tratadas previamente com os indutores não apresentaram diferença significativa de atividade após inoculação com o patógeno (Figura

2A), no entanto as plantas do clone VR previamente tratadas ASM demonstraram aumento significativo na atividade da enzima 48 horas após inoculação (Figura 2B). No patossistema cacau-*Verticilium dahliae*, Cavalcanti (2000) e Resende et al. (2002) também observaram aumento na atividade da enzima peroxidase, destacando ser essa uma importante alteração fisiológica no processo de resistência induzida, em resposta à pulverização de plântulas de cacauero com Acibenzolar-S-metil. Segundo Fernandes (1998), a atividade peroxidásica a partir da indução advém de uma seqüência de eventos e sinais, partindo de uma isoforma pré-existente, catalizando o último passo enzimático da biossíntese da lignina, servindo como barreira ao patógeno, ou mesmo interagindo com a quitina da parede celular de muitos fungos atuando conjuntamente com β -1,3-glucanase.

O produto da autoclavagem da levedura *S. cerevisiae* obtido a partir de fermento biológico Fleischmann® quando aplicado nas plantas do clone VR, induziu um aumento significativo na atividade peroxidase em plantas inoculadas e não inoculadas com o fungo *P. psidii* (Figura 2B). Diferentemente da ação do Acibenzolar-S-metil esse incremento não foi maior após inoculação com o fungo, ou seja, o aumento do nível de quitinase nas plantas tratadas com a levedura foi em decorrência apenas de sua ação. Fato esse que pode estar diretamente ligado com a eficácia da levedura na proteção do eucalipto contra o patógeno (tabela 1).

Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade de Fenilalanina amônia-liase nas plantas do clone C0 pulverizado com H₂O destilada apresentou estabilidade no decorrer do tempo, e com a presença do patógeno houve um aumento significativo 72 horas após inoculação (Figura 3A). As plantas do clone VR pulverizadas com H₂O também apresentaram aumento significativo da

enzima após inoculação (Figura 3B), no entanto esse incremento foi menos expressivo que os apresentados pelas plantas do clone C0 e se deu 48 horas após inoculação. Sendo assim a rapidez e/ou intensidade com que a reação de defesa ocorreu, podem ter sido determinantes na resistência ao patógeno, visto que de acordo com os resultados obtidos notou-se que as plantas do clone C0 sem tratamento prévio com indutores apresentaram menor severidade da doença do que as plantas do clone VR segundo a escala de notas utilizada (Tabela 1).

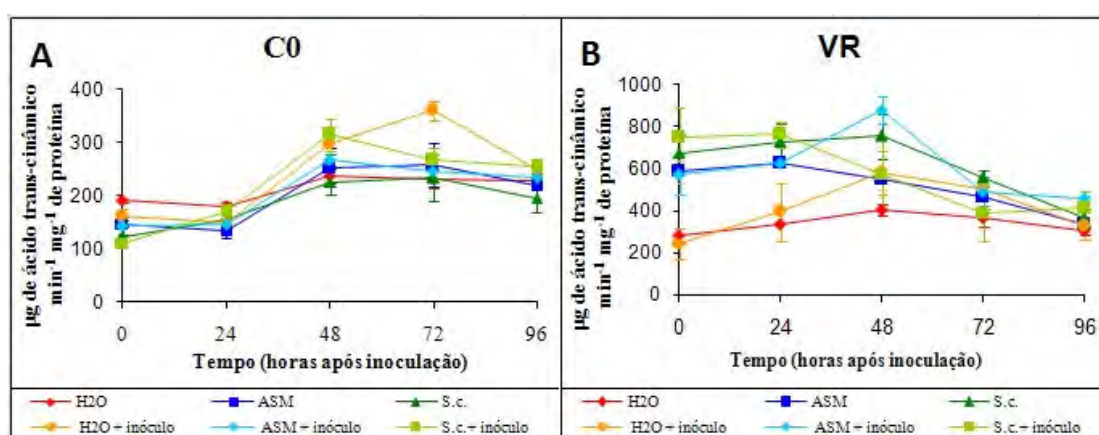


Figura 3. Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL) do tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *Puccinia psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) e água destilada (H₂O) 5 dias antes da inoculação e coletados em 5 épocas: 0, 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação.

Esse aumento da atividade da enzima pode ser considerado um indicador de resistência, desde que FAL é absolutamente requerida para a síntese de fenóis, compostos que estão associados à expressão de resistência. Para Nakazawa et al. (2001), a atividade da FAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notadamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, com participação de fenilalanina e sua conversão em ácido-transcinâmico, catalisada pela FAL, resultando em compostos como

fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos.

Em todas as situações as plantas do clone C0 apresentaram níveis de atividade da enzima inferiores às plantas do clone VR (Figura 3A e B), podendo inferir uma grande importância na genética do material na expressão de atividade da enzima, uma vez que, mesmo as plantas do clone VR não inoculadas e não tratadas com os indutores apresentaram atividade da enzima superior àqueles verificados pelas plantas do clone C0. Tal fato poderia estar relacionado com diferentes mecanismos de defesa estruturais existente entre os clones ou devido a importância de outras rotas metabólicas envolvidas no processo de defesa da planta. Campos et al. (2003) induziram resistência em quatro cultivares de feijoeiro com ASM e um isolado de *C. lindemuthianum* avirulento e observaram que o fungo e o Acibenzolar-S-metil induziram a atividade da FAL, porém, a magnitude dessa atividade variou em função do cultivar.

O tratamento com Acibenzolar-S-metil ou com *S. cerevisiae* em plantas do clone C0 não induziram aumento significativo na expressão da enzima, comparada com a testemunha aspergida com água, já o clone VR, os indutores aumentaram significativamente a atividade da enzima entre 0 e 72 horas quando comparados com as plantas testemunhas pulverizada com água, vale ressaltar que o tratamento com os indutores ocorreu cinco dias antes a inoculação. O aumento da atividade da enzima seria resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram estresse no caso a aplicação dos indutores. Com isso, a planta provavelmente estaria em condições de mostrar resistência contra patógenos aos quais normalmente seria suscetível.

As plantas do clone C0, que receberam tratamento prévio com indutor Acibenzolar-S-metil, não apresentaram diferença significativa da atividade da enzima após inoculação com o patógeno (Figura 3A), entretanto, as plantas do clone VR, que receberam o tratamento com Acibenzolar-S-metil, apresentaram elevação da atividade da enzima 72 horas após inoculação (Figura 3B), evidenciando que esse mecanismo foi acionado, apresentando um aumento de expressão a partir do desafio com o patógeno nas plantas pré-condicionadas pelo efeito do ASM, justificando a eficácia do produto no controle da doença (Tabela 1). Em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], plântulas tratadas com ASM e inoculadas com *Colletotrichum destructivum* também apresentaram aumento da resistência, comprovada com o aumento da enzima FAL (Latunde-Dada & Lucas, 2001).

O efeito da levedura nas plantas do clone C0 apesar de não elevar a expressão da enzima em função do seu tratamento, quando inoculadas com o patógeno pode se notar aumento da atividade da enzima 48 horas após inoculação evidenciando também o efeito do pré-condicionamento das plantas pela levedura e a consequente eficiência no controle da doença. Sobre as plantas do clone VR tratadas com *S. cerevisiae* é possível observar na figura 3B que até 48 horas após inoculação as plantas mantinham níveis elevados na atividade da enzima, comparado as plantas não tratadas, e após esse período a atividade da enzima tendeu a diminuir. Gallao et al. (2007) verificando a atividade da Fenilalanina amônia-liase em folhas de *Citrus aurantium* elicítadas com quitina observaram um aumento nas primeiras horas após elicitação e subsequente diminuição de atividade. Segundo os autores tal fato está correlacionado com a capacidade da cultura em rapidamente restaurar seu metabolismo normal.

Atividade de Polifenoloxidasas

O comportamento da atividade de polifenoloxidase não foi alterado quando comparado as plantas dos diferentes clones, quando receberam tratamento com os indutores de resistência ou quando foram desafiadas pelo patógeno. Além de apresentar níveis muito baixos da atividade da enzima (Figura 4 A e B).

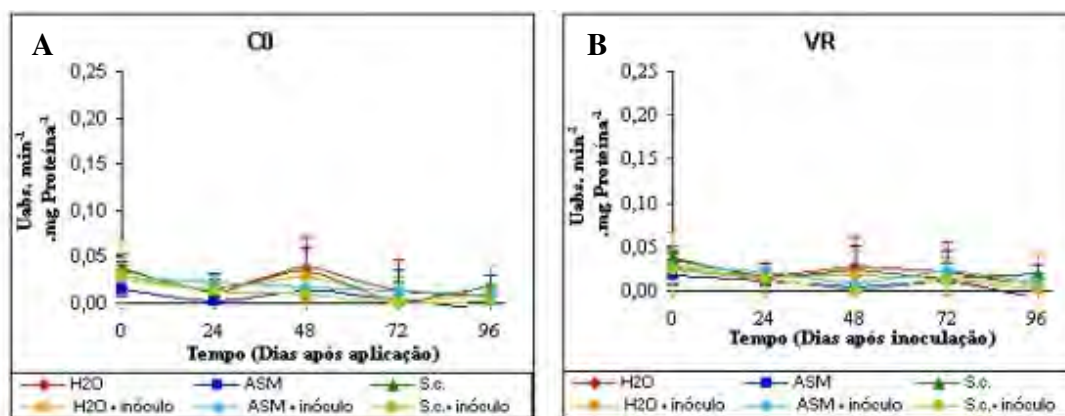


Figura 9. Atividade de polifenoloxidase do tecido foliar de *Eucalyptus* dos clones C0 (moderadamente resistente) e VR (suscetível) inoculados e não inoculados com *Puccinia psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil (ASM), *Saccharomyces cerevisiae* (S.c) e água destilada (H₂O) e coleta das folhas realizadas em 5 diferentes épocas: 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Segundo Nojosa et al. (2003) verificando relação de fenóis solúveis totais e da atividade de enzimas polifenoloxidasas em tecidos de clones de cacau, observou que a relação entre a atividade das enzimas oxidativas apresentou uma correlação negativa significativa com os níveis de fenóis em quase todos os clones estudados. Ao que parece, sob altas concentrações de compostos fenólicos, as enzimas que oxidam compostos fenólicos, como polifenoloxidase, são inibidas em folhas. Uma inibição de polifenoloxidasas por fenóis também já foi encontrada por Rivero et al. (2001) em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) e melancia [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum & Nakai], quando o alto

nível de fenóis foi correlacionado com uma alta atividade de fenilalanina amônia-liase, enzima chave na rota de fenóis na maioria das dicotiledôneas. Em cacau, uma relação inversa também foi encontrada por Ndoumou et al. (1997) em tecidos de embriogênese somática, entre fenóis e enzimas oxidativas (peroxidase e IAA-oxidases), sendo que uma isoenzima de peroxidase ácida desapareceu dos tecidos com níveis altos de fenóis.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Sérgio Florentino Pascholati por permitir a realização desse trabalho no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de plantas do setor de fitopatologia da ESALQ-USP , à toda a equipe do laboratório em especial ao Dr Odair José Kuhn.

A equipe de melhoramento da Votorantim Celulose e Papel (VCP), por cederem material contrastante para este estudo, nas pessoas de Cezar Bonine, Donizete C. Dias.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; ROSA, O.P ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil..P; Fitopatologia brasileira, v.26, n.2, p.221, 2001
- APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B., FURTADO, E.L. Efeito da idade e temperatura na germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* coletados de jambeiro (*Syzygium jambos*) e de goiabeira (*Psidium guajava*). *Summa Phytopathologica*, v.29, p.30-3, 2003

- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. *Physiological Plantarum*, v. 85, p. 235 -241, 1992
- BENHAMOU N, BELANGER R. Benzothiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis* in tomato. *Plant Physiology* 118, 1203– 12. 1998
- CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; SILVA, J.B.; OSÓRIO, V.A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Londrina, v. 15, p. 129-134, 2003.
- CARDOSO FILHO, J.A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, Acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Telemorfo: *Guignardia citricarpa*) Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 125p., Piracicaba, 2003
- CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. Em plântulas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM). Lavras, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Lavras
- DUANGMAL, K.; APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, London, v. 64, p. 351-359, 1999
- FERNANDES, C.F. Estudo da atividade peroxidásica em folhas primárias de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] cv. Vita 3. (Dissertação de Mestrado). Fortaleza, CE. Universidade Federal do Ceará. 1998.

- GALLAO, MARIA I., CORTELAZZO, ANGELO L., FEVEREIRO, MANOEL P. S.
Respostas a quitina em cultura de células de *Citrus aurantium* em suspensão. *Braz. J. Plant Physiol.*, Jan./Mar. 2007, vol.19, no.1, p.69-76. ISSN 1677-0420.
- GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H.A. Two step control of basic and acidic peroxidase and significance for growth and development. *Physiologia Plantarum*, v.64, p.418-423, 1985
- GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Piracicaba, 2004. 236p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.
- GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.68, n.1, p.89-94, 2001.
- HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease control*. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. cap.8, p.177-199.
- JUNQUEIRA, A.C.B, Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento Dissertação (mestrado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 75p., Piracicaba, 2003
- KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2007

- LABANCA, E.R.G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002
- LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp) seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 58, p. 199-208, 2001
- LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.25, p. 244-249, 1999
- MAZARO S.M. Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 87p. 2007
- MOERSCHBACHER, B.M. 1992. *Plant peroxidases*: involvement in response to pathogenes. In: Penel, C., Gaspar, T., Greppin, H. (Eds). *Plant peroxidases 1980-1990*. University of Geneva, p. 91-9.
- NAKKAZAWA, A., NOZUE, M. & YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Research* 14:323-328.2001.
- NOJOSA, GUTEMBERG BARONE A., RESENDE, MÁRIO LÚCIO V., AGUILAR, MARCO ANTÔNIO G. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatol. bras.*, Mar./Apr. 2003, vol.28, no.2, p.148-154. ISSN 0100-4158.

- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 22, p. 417-453.
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). Plant Pathology, v.51, p.621-628, 2002.
- RONCATO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Scientia Agricola, v. 55, n.3, p. 395-402, 1998
- RONCATO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Alterações na atividade da peroxidase em mesocótilos de milho e sorgo em resposta ao tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*. Fitopatologia Brasileira, v.22, p.303, 1997. Suplemento.
- SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Embrapa: Circular Técnica. Colombo, Junho, 2001
- SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of phenylalanine ammonia-lyase isoforms in tomato leaves. *Phytochemistry*, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, 1998
- SCHALLENBERGER, E.. Fatores que predisõem as plantas cítricas ao ataque de coleobrocas. Botucatu. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista. 1994
- SOBRINHO, A.C. Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola

- Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.
- TAKAHASHI, S.S. Ferrugem do eucalipto: Índice de infecção, análise temporal e estimativas de danos relacionados à intensidade da doença no campo. Botucatu, 2002, 101p. Tese (Mestrado/Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas.
- UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. Phytoparasitica, Bet Dagan, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEM, E.A. The families of pathogenesis-related protein, and their activities and comparative analysis of PR-1 type protein. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, v. 55, p. 85-97, 1999
- VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-62. 2006
- WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Fitopatologia Brasileira, v. 24, p. 428-435, 1999.

CAPÍTULO IV

***EUCALYPTUS* ESTS INVOLVED IN THE MECHANISMS AGAINST PLANT
PATHOGEN AND ENVIRONMENTAL STRESSES**

***Eucalyptus* ESTs involved in the mechanisms against plant pathogen and environmental stresses**

Daniel Dias Rosa^{1,3}; Karina Carnielli Zamprogno²; Leonardo Pires Boava¹; Celso Luis Marino²; Edson Luiz Furtado^{1,3}

¹ Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP.

² UNESP, Instituto de Biociências, Botucatu-SP ³ Bolsista do CNPq-Brasil. E-mail: elifurtado@fca.unesp.br.

Autor para correspondência; Edson Luiz Furtado

Data de chegada: / / Aceito para publicação / /

ABSTRACT

Rosa, D.D.; Zamprogno, K.C.; Boava, L.P.; Marino, C.L.; Furtado, E.L. *Eucalyptus* ESTs involved in the mechanisms against plant pathogen and environmental stresses. *Summa Phytopathologica*, v. , p. - , 2008.

The eucalypt plantation has very high economical importance in Brazil and it is attacking with many pathogens and environment stress conditions. Disease resistance and survival at unfavorable environmental conditions revealed that eucalypt have evolved highly efficient defense systems. Here we showed the results of data mining from the *Eucalyptus* ESTs Genome Project (FORESTs). Utilizing the sequencing of the expressed sequence tags (ESTs) derived from induced and not induced cDNAs libraries by stress agents, we identified EST clusters similar to others plant-signaling molecules, phytoalexins and lignin biosynthesis

pathway, PR-proteins and putative genes corresponding to enzymes involved in detoxification of reactive oxygen species. We also present general considerations about the mechanisms of *Eucalyptus* defense against biotic and non biotic stress. This information is of extreme value for future eucalypt breeding programs aiming to develop plants with enhanced resistance against pathogens.

Additional keywords: *Eucalyptus*, resistance, plant-signaling, phytoalexins, PR-proteins.

RESUMO

Rosa, D.D.; Zamprogno, K.C.; Boava, L.P.; Marino, C.L.; Furtado, E.L. ESTs de *Eucalyptus* envolvidos nos mecanismos contra fitopatógenos e estresse ambiental. *Summa Phytopathologica*, v. , p. - , 2006.

A cultura do Eucalipto tem importância econômica muito elevada no Brasil e vem sofrendo inúmeros ataques de patógenos, além de essa cultura estar sujeita aos inúmeros estresses ambientais. A resistência e sobrevivência desta cultura frente às circunstâncias ambientais desfavoráveis, e ataques de pragas e doenças, revelaram que o Eucalipto apresenta um sistema de defesa evoluído e altamente eficiente. Aqui nós apresentamos os resultados obtidos no projeto do genoma de ESTs do *Eucalyptus* (FORESTs). Agrupando as seqüências de cDNA expressas (ESTs) obtidas pelo projeto, montou-se grupos (contigs) de seqüências similares provenientes de cada biblioteca de cDNA induzidas e não induzidas por agentes estressantes, identificou-se os grupos de seqüências de cDNA similares a outras moléculas já conhecidas, como moléculas de plantas-sinalizadoras, fitoalexinas e vias de biossíntese de lignina,

proteínas-RP e supostos genes correspondendo às enzimas envolvidas na detoxificação de moléculas de oxigênio reativo. Apresentamos também, considerações gerais sobre os mecanismos de defesa do Eucalipto contra o estresse biótico e abiótico. Estas informações são de extraordinário valor para a produção de Eucalipto e ajudarão no futuro a direcionar programas de melhoramento do Eucalipto, visando assim obter plantas com melhor resistência contra os patógenos e estresses ambientais.

Palavras-chave adicionais: *Eucalyptus*, resistência, fitoalexinas, Proteínas-RP.

Several defense mechanisms against pathogens attack are known in plants. Each of these are controlled by different genes set, some of them have been almost identified. These mechanisms can be divided in two groups: those depending of interactions between host and pathogen (resistance genes) and others related to unspecific response to pathogens, phytoalexins, PR-proteins, etc. (12).

Currently genes belongs to the system gene-to-gene, proposed by Flor (15), can be divided in two groups, one group has a coding region for leucine-rich repeats (LRRs) and other group has a coding region for a nucleotide binding site (NBS). These domains can be involved in the mechanism recognition plant - pathogen and these proteins recognizing extracellular products of avirulence (*avr*) genes, received as elicitor by the host (5).

The class of resistance genes characterized by presenting LRRs and also function of protein-kinase, with absence of NBS, for example, the gene LR10 of wheat resistance to *Puccinia* (14).

Nowadays, the expressed sequence tag (EST) sequencing approach allows for the analysis of expressed genes and has accelerating the gene discovery. The establishment of putative functions for ESTs utilizing comparisons with the genes and sequences whose functions are already known is very important for the knowledge of the defense mechanisms. These hypotheses can be tested on functional genomics procedures and those results can help the plant breeding process. ESTs can also be used as useful probes for mapping studies (19).

The objective of this study was to identify ESTs in the *Eucalyptus* EST Bank (FOREST) with high similarity to genes involved in plant defense mechanism against biotic and not biotic stress (Figure 1). The understanding of the genetic basis of these defense mechanisms will help the genetic improvement of those traits on *Eucalyptus*.

MATERIAL AND METHODS

The *Eucalyptus* genome project (FORESTS) (16) was developed for a consortium of four Brazilian Forest Companies and the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP). It was accomplished with the participation of 20 laboratories from São Paulo network, called AEG (<https://forests.esalq.usp.br>), obtaining 123.889 reads. All sequence used during this work is derived from cDNA libraries specific to different tissues, organs or conditions of growth from the species *E. grandis*, *E. globulus*, *E. saligna* and *E. urophylla*. The libraries were constituted of wood (WD), bark (BK), floral buttons (FB), leaves (LV), seedlings (SL), stem (ST), root (RT), and callus (CL) (<https://forests.esalq.usp.br/Librariesinfo.html>).

The search for DNA sequence that coding for proteins and enzymes involved in the *Eucalyptus* defense mechanism against biotic and abiotic stresses was carried out using a

BLAST-P program with a threshold value of E-value $< 10^{-46}$ (3). Each sequence that coding these proteins used for analysis was from National Center for Biotechnology Information (NCBI) and then, the protein was analyzed by using the TBLASTN program (3) against *Eucalyptus* EST clusters. Once the corresponding putative protein of the *Eucalyptus* cluster was obtained it was again aligned by using the BLASTX program to NCBI in order to check the sequences.

RESULTS AND DISCUSSION

Cell surface communications and signaling system

The cell wall plant is the first line of defense against any potential pathogen and environments chances. Spores of many pathogenic fungi produce, or are coated with adhesive material assisting attachment to the plant surface. Upon germination a germ tube grows across the plant surface, often in response to specific environmental and to specific location. A variety of strategies are employed to enter the host inducing the elaboration of a specialized infection cell, the appressorium.

The cuticular layer is composed of surface waxes and a hydroxy fatty acid polymer named cutin (26). The monomeric components of cutin fall into 2 broad families of compounds consisting C16 and C18 chains. Uchiana & Okuyama (50) identified two major cutin components wich induced appressorium formation at nanomolar concentrations and fungous behavior studies after alterations in the carbon chain in the fatty acid.

Sweigard et al. (49), suggested that many fungus secretes cutinases in the leaf surface, and the extracellular cutinase may promote the release of cutin monomers which may bind to a specific subcellular receptor resulting in the induction of a presorium formation.

A number of conserved pathways are involved into transducing signals from the environment within cells. These are controlled by such molecules as cyclic nucleotides, Ca^{++} , and phosphoinositides. The extracellular signals are transduced via protein-protein interactions (35). Reversible covalent modifications of proteins by phosphorylation mediated by the opposing reactions of kinases and phosphatases, as well as the analogous exchanges of phosphate potentials on GTP-binding proteins play essential roles in signal transduction. The receptors in the membrane and responsible for the pathogen-host specificity are similar to kinase receptor-like proteins (RPK) found in animals and plants (28). The RPK proteins have three main domains: a) extracellular domain leucine-rich repeats (LRR) and leucine zipper motif (LZ) involved in the recognition and protein-protein interaction; b) transmembrane domain (hydrophobic) related to the membrane binding and finally, c) intracellular domain with catalytic function (kinase). The resistant genes are classified into classes. The first class corresponds to the genes encoding for proteins LRR and nucleotide binding site (NBS) with or without LZ region. The NBS-LRR type comprises genes containing both a 5' terminal NBS and 3' terminal LRRs of various lengths.

In our search at the FOREST database we found genes homologous to LRR and NBS-LRR type resistant protein, HV1LRR1 and HV1LRR2, disease resistance protein RPM1, RPR1h protein, LRR1 protein, and L-zip+NBS+LRR protein (Table 1). The second class, with a kinase and/or a LRR domain, is represented by *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-9*, *Xa-21*, and *Pto* genes, which possess a 5' LRRs and/or a serine/threonine kinase domain (4). Evidence supports that

the highly variable LRRs in both classes of R genes might have a role in pathogen recognition, providing a structural backbone that has been modified over evolution in response to variation in *Avr* gene products from the pathogens (39). Those enzymes are easily localized because they have transmembrane domain. The proteins encoded by *Pto*, *Xa21*, *Fen* genes have a catalytic site (kinase) in the C-terminal protein portion, which is probably involved in the protein phosphorylation during the signal transduction. In the FOREST databank there are EST sequences similar to kinases and/or a LRR domain-resistant gene type and, the EST clusters are similar to receptor-like serine/threonine kinase of *A. thaliana*, MAP3K protein kinases of *A. thaliana* and *Oryza sativa* (Table 1).

Table 1. *Eucalyptus* putative homologue biotic and abiotic resistance genes at FORESTs database.

Putative genes	Specie	FORESTs number	NCBI Accession	E-value
LRR receptor-like protein kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGSBRT3120G04.g	7269703	2e ⁻⁷⁹
Hv1LRR1	<i>Hordeum vulgare</i>	EGCECL1282E03.g	5669778	6e ⁻³⁴
Hv1LRR2	<i>Hordeum vulgare</i>	EGCECL1282E03.g	5669782	6e ⁻³⁸
RPM1 homolog disease resistance protein	<i>Sorghum bicolor</i>	EGCECL1282E03.g	4680207	2e ⁻³⁷
RPR1h	<i>Oryza sativa</i>	EGCECL1282E03.g	4519938	3e ⁻³⁴
LRK1 protein	<i>Oryza sativa</i>	EGEPCL2204D05.g	22093632	3e ⁻⁸⁰
L-zip+NBS+LRR	<i>Oryza sativa</i>	EGSBSL7030E12.g	4519258	4e ⁻²⁷
Receptor-like Serine/threonine kinases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGSBSL7030E12.g	4519258	4e ⁻²⁷
MAP3K epsilon kinase protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGJERT3184A07.g	15231910	1e ⁻¹¹⁹
MAPK mitogen-activated protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	EGABRT3014F10.g	7328530	2e ⁻¹⁴
Ser/Tre kinase Ctr 1 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGBGBK1051A06.g	Q05609	0.0
Kinase protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGABLV2279DA01.g	22474449	1e ⁻¹⁶⁰

Salicylic acid (SA) in plants is involved in various physiological processes like stomata closure, flower induction, and heat production, and plays a central role in defense against pathogen attack. To date, plant genes known to be induced by SA are not primary response

genes, but rather they respond later and are dependent on new protein synthesis. This class of genes is exemplified by the pathogenesis-related (PR) proteins, such as PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 and PR-5 (53). The biosynthetic pathway of SA appears to begin with the conversion of phenylalanine to transcinnamic acid (t-CA) catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase (PAL).

The plant hormone ethylene is synthesized during several stages of the development, including germination of seeds and ripening, and as a response to infection by pathogens and wounding by herbivores (48). Ethylene plays an important role in plant defense to pathogens attacks as one of the systemic signal transducers (1). It activates the transcription of defense-related genes of PR proteins (48), which are widely distributed in plants and are toxic to invading pathogens. The biosynthesis of ethylene is largely understood. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase have a main role in the ethylene synthesis. ACC synthase catalyzes the conversion of S-adenosyl-L-methionine (SAM) to (ACC), and ACC oxidase converts ACC to ethylene, carbon dioxide, and cyanide (13). EST clusters related to ACC synthase and ACC oxidase enzymes involved in the biosynthesis of ethylene are present in the eucalypt database (Table 2).

Ecker (13) proposed the following model to ethylene response pathway: ethylene may bind to and activate the receptor, which together may inactivate the CTR1, that codes for a product that acts as a negative regulator of the ethylene response pathway allowing the product of gene EIN2 activate a number of terminal ethylene regulated genes, possibly acting on genes like EIN3 and ERFs. The enzyme coded by CTR1 has kinase functions, which is important to its functions in the phosphorylation cascade in the ethylene signaling events. A homologous to CTR1 of *Arabidopsis thaliana* is present in FORESTs database (Table 2). Predict amino acids of eucalypt similar to the ERFs (EREBCPs) were founded in the databank.

Table 2. *Eucalyptus* putative homologues genes involved with plant signaling molecules at FORESTs database.

Putative genes	Specie	FORESTs number	NCBI accession	E-value
Lipoxygenase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGEZST7215D11.g	20259579	2e ⁻¹¹⁶
Lipoxygenase	<i>Solanum tuberosum</i>	EGEZLV1202D12.g	6689343	1e ⁻¹²⁵
Allene oxide synthase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	EGACLV3272B08.g	7677378	3e ⁻⁶⁷
Allene oxide cyclase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	EGQHRT6038H05.g	15797681	2e ⁻⁶⁸
1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	<i>Triticum aestivum</i>	EGCERT6019F05.g	1173638	9e ⁻⁸¹
1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	<i>Oryza sativa</i>	EGCERT6019F05.g	6006360	4e ⁻⁸¹
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	<i>Oryza sativa</i>	EGJFSL4202G05.g	23495703	2e ⁻⁴²
1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	<i>Phyllostachys edulis</i>	EGABLV2282G06.g	12862572	1e ⁻¹⁰⁰
Ethylene-response protein – ERS	<i>Oryza sativa</i>	EGSBRT6210E05.g	15054446	2e ⁻¹⁰¹
Serine/Threonine-Protein Kinase CTR1	<i>Rosa</i> (hybrid cultivar)	EGBGBK1051A06.g	AAK40361	0.0
Transcription factor EREBP1	<i>Oryza sativa</i>	EGABLV2285C11.g	6689918	3e ⁻⁴⁶

The ethylene responsive defense genes are the PR-2 (glucanases) and PR-3, PR-4, PR-8 and PR-11 (chitinases). The substrates of those two types of enzymes, chitinases and glucanases, suggest that they act against cell walls of fungi and bacteria (51). The data suggest that the eucalypt ethylene biosynthesis and response is very similar to other plants.

Ethylene is a volatile vegetable hormone of multiple functions in the plant. It is known that the same the sintetisa as much as answer to wounds as to the infection for pathogens (7).

Kieber et al. (24) they examined a million plants of *A. thaliana*, they observed that among them there were mutants that were not affected for the ethylen, stopping reacting to the presence of the same, or of the you nourish that you/they inhibit him/it, tends his/her altered growth. These mutants don't possess the gene that in the capacity to command the production

of the enzyme protein - kinase, that adds a protein phosphatic group. The gene protein-kinase is similar with the relative ones to present enzymes in plants, animals and men, what suggests the existence of an universal link in the way that the alive beings interpret their messengers.

Jasmonic acid (JA) and its methyl ester (MeJA) derivative is ubiquitously occurring plant compound. Additionally, to its participation as a plant growth regulator, JA has an important role in plant defense, acting as an intracellular signal transducer and inducer of defense gene transcription (6). JA is synthesized from oxylipin pathway and is induced by abiotic and biotic stress, as wounding, osmotic stress, pathogen attack and elicitor treatment. JA action is thought to be mediated by a still unknown JA-receptor. Pathogenesis-related proteins PR-2 (β -glucanases), PR-3 and PR-4 (chitinases), PR-5 (thaumatin-like proteins), PR-6 (proteinase inhibitor), PR-10 (ribosomal inhibitor proteins), HRGP (extensions) and cyclophylin are defensive proteins known to be jasmonate-induced. The first compound metabolized in the JA biosynthesis is α -linolenic acid (LA). The major source of LA is the plastid membranes and it is substrate for the lipoxygenase (LOX). In the FOREST database we found highly similar LOX to other dicotyledonous LOX such as *A. thaliana* and potato (Table 2). LOX were expressed in most sugarcane tissues, although in higher amounts only in roots or plants infected with bacteria (28).

The next step in the JA biosynthesis is the formation of allene oxide, through allene oxide synthase (AOS) and allene oxide cyclase (AOA) enzymes. AOS enzyme is present with high homology to AOS from tomato. AOS and AOA homologous enzymes were identified in the FOREST database (Table 2).

Detoxification genes and species reactivate of oxygen

With reference to the Glutathione S-transferase (GST) enzyme, McGonigle et al. (31) concluded that a high hydrogen peroxide level induced a great increase in the enzyme's mRNA in soybean cells. Most GSTs found in plants were isolated as a result of their induction by several treatments, including indole acetic acid, ethylene, herbicides, infection by pathogens, intoxication by heavy metals, and high temperatures (31). Several GSTs were identified in a variety of plant species, and their complete sequence of primary amino acids was determined. The identification of homologous genes associated with GST was performed by comparing the information available from the NCBI and GeneBank database with information available from the sequences database of the FORESTs project. With regard to the GST enzyme, clusters EGRFST2233B11.g was selected, since they showed the best e-values as well as the best identity when compared with different organisms (table 3).

Table 3. *Eucalyptus* putative homologues genes involved with detoxification of reactive oxygen species (ROS).

Putative genes	Specie	FORESTs number	NCBI accession	E-value
Superoxide dismutase [Mn]	<i>Zea mays</i>	EGEZSL8253H05.g	7548002	5e ⁻⁹⁶
Superoxide dismutase (Cu-Zn)	<i>Raphanus sativus</i>	EGFFB1039E04.b	AAL07333	2e ⁻¹⁰¹
Superoxide dismutase[<i>cu-zn</i>] 4A - cytosolic	<i>Zea mays</i>	EGCCST6227F01.g	6018746	6e ⁻⁷⁴
Glutathione S-transferase GST 10	<i>Glycine max</i>	EGBMLV2260C10.g	AAG34813	3e ⁻¹⁰²
Glutathione S-transferase GST	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGRFST2233B11.g	11967658	6e ⁻⁷⁶
Glutathione S-transferase GST	<i>Capsicum annuum</i>	EGRFST2233B11.g	24061761	3e ⁻⁸³
Putative phospholipid hydroperoxide glutathione	<i>Oryza sativa</i>	EGSBRT3123D01.g	gil11545686	4e ⁻⁷⁰
Peroxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGEQST2200H09.g	AAN31858	5e ⁻¹²⁰
GPX12Hv -glutathione peroxidase-like protein	<i>Hordeum vulgare</i>	EGRFST6257E07.g	gil6179600	4e ⁻⁷⁹
Glutathione peroxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGRFST6270H10.g	gil20465389	3e ⁻⁶⁹
Catalase	<i>Pisum sativum</i>	EGEQLV1201F10.g	CSPM	0.0
	<i>Zea mays</i>	EGEZLV3268A11.g	168437	1e ⁻¹³⁴

According to Scandalios (42), the evolutive origin of Superoxide Dismutase (SODs) is not clear; however, the available information suggests that the three existing types of SOD are included in two phylogenetic families, Cu/ZnSOD and Fe-/MnSODs. FeSODs and MnSODs are closely related since they share a high degree of identity between their amino acid sequences and homologous structures, but are not related to Cu/ZnSODs.

When a plant enters senescence, the activities of all SODs enzymes and other oxygen-detoxifying enzymes (such as catalase and glutathione reductase) decrease. Such observations are consistent with the proposition that free radicals play an important role in senescence and in the process of aging. The identification of homologous genes associated with Fe/SOD was performed by comparing the information available from the NCBI and GenBank database with information available from the sequences database of the FORESTs project. Clusters EGEQRT3100G07.g and EGEZRT3005F09.g were selected, since they showed the best e-values as well as the best identity when compared with different organisms (table 3). The similarity between sequences from clusters and the selected organisms can be observed in the species *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus*.

Peroxidase can be taken as a biochemical stress marker resulting from both biotic and abiotic factors. According to Gaspar et al. (17), peroxidase is the key molecule in the adaptation of plants, or some of their organs individually, to environmental changes. The identification of homologous genes associated with peroxidase was performed by comparing the information available from the NCBI and GeneBank database with information available from the sequences database of the FORESTs project. Cluster EGEQST2200H09.g was selected, since they showed the best e-values as well as the best identity when compared with *A. thaliana* (table 3).

Catalase (CAT) is a metalloprotein in the group of porphyrins, found in all aerobic organisms, which catalyzes hydrogen peroxide dismutation converting it into water and molecular oxygen. The identification of homologous genes associated with CAT was performed by comparing the information available from the NCBI and GeneBank database with information available from the sequences database of the FORESTs project. Cluster EGEQLV1201F10.g was selected, since they showed the best e-values as well as the best identity when compared with *Pisum sativum* (table 3).

Phytoalexins

Phytoalexins are low molecular weight antimicrobial compounds, produced by plants as a result of stress or infection. They are localized around the site of infection and the speed and magnitude with which they are produced and accumulate appear to determine disease reaction in some plants interactions with fungi and bacteria (27). The plants produce phytoalexins according to their botanical families, but are predominating the isoflavonoids, sesquiterpenoids, polyacetylenes and furano-sesquiterpenoids. There are 102 phytoalexins reported in the Leguminosae: 84 are isoflavonoids; 8 are furanoacetylenes, 4 stilbenes, 3 are benzofurans, 2 are chromones and 1 is flavone. Three basic pathways for the biosynthesis of secondary metabolites in plants are the acetate-malonate, acetate-mevalonate and shikimate (27).

The synthesis of phytoalexins in plants is bound to the general metabolism of the phenylpropanoids, including enzymes related to other processes, such as phenylalanine ammonia-lyase (PAL), caffeic acid 3-O-methyltransferase (COMT) and 4-coumarate CoA ligase (4CL). The process also has specific enzymes such as, chalcone synthase (CHS),

chalcone isomerase (CHI), isoflavanone synthase (IFS), isoflavone reductase (IFR). The PAL is the first and a key regulatory enzyme in the metabolic pathway of phenylpropanoids, which catalyzes the deamination of L-phenylalanine to produce *trans*-cinnamic acid, leading to the formation of wide range of secondary metabolites (43). In the FOREST database we found clusters similar to PAL enzyme (Table 4) and enzymes COMT, 4CL, CHS, CHI, IFS, IFR involved in phytoalexin biosynthetic pathway.

Table 4. *Eucalyptus* putative homologues genes involved with secondary compounds pathway

Putative genes	Specie	FORESTs number	NCBI accession	E-value
Phenylalanine ammonia-lyase	<i>Nicotiana tabacum</i>	EGJFCL4208B06.g	2564057	1e ⁻¹⁴³
Phenylalanine ammonia-lyase - PAL	<i>Eucalyptus</i> spp.	EGCCSL5065E07.g	5690433	2e ⁻¹²²
Enol piruvil shiquimate 3 fosfato sintase	<i>Brassica napus</i>	EGEQRT3102H01.g	P17688	0.0
Phenylalanine ammonia-lyase - PAL	<i>Eucalyptus</i> spp.	EGCCSL5065E07.g	5690433	4e ⁻¹²²
Quercetina 3-O-methyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGEQRT3104D08.g	Q9FK25	2e ⁻¹⁶⁸
Caffeic acid 3-O-Methyltransferase	<i>Zea mays</i>	EGEQRT3104D08.g	Q0659	3e ⁻¹²⁰
4-coumarate—CoA ligase	<i>Glicine max</i>	EGEQRT3001E07.b	AAC97600	0.0
cinnamyl-Co-A reductase	<i>Pinus taeda</i>	EGEQRT5001C10.g	AAL47684	5e ⁻¹³²
cinnamyl-alcohol dehydrogenase	<i>Medicago sativa</i>	EGEQFB1004E07.g	AAL34329	6e ⁻¹²⁶
4-hydroxycinnamic acid--CoA ligase	<i>Sorghum bicolor</i>	EGJFWD2321C04.g	763046	2e ⁻⁷¹
Chalcone synthase 6	<i>Sorghum bicolor</i>	EGJEWD2308B10.g	5305917	3e ⁻¹¹⁵
Naringenin,2-oxoglutarato 3-dioxygenase	<i>Vitis vinifera</i>	EGEQRT3300C12.b	P41090	3e ⁻¹⁶⁷
Naringenin-chalcone synthase	<i>Oryza sativa</i>	EGJEWD2308B10.g	gil19881608	2e ⁻⁴⁷
Flavone 3 beta-hydroxylase	<i>Solanum tuberosum</i>	EGEQRT3300C12.b	AAM48289	1e ⁻¹⁶⁹
Flavone hydroxylase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGACRT6209G11.g	6979554	1e ⁻¹⁴⁷
Isoflavone reductase (IFR))	<i>Zea mays</i>	EGCCRT6013E03.g	gil1205986	2e ⁻⁸⁶

Pathogenesis-related proteins (PR-Proteins)

PR-1: is the most abundant of PR proteins, is induced in infected plant tissue (2). The PR-1 genes are expressed by various external stimuli like pathogens, wounding, chemical elicitors, hormones, UV light (9) and salicylic acid. PR-1 proteins contain a hydrophobic N-terminal region of 30 amino acids that probably have function as a signal peptide for translocation to the endoplasmatic reticulum (38). The FOREST database has sequences

(EGSBRT3122B04.g and EGBMCL1291G04.g) similar to PR-1 of *C. annuum* and a precursor protein of maize respectively (Table 5).

Table 5. *Eucalyptus* putative homologues genes involved with PR-proteins.

Putative genes	Specie	FORESTs number	NCBI accession	E-value
PR-1	<i>Capsicum annuum</i>	EGSBRT3122B04.g	gil13560653	4e ⁻⁵⁸
PR-1 Maize PRMS precursor	<i>Zea mays</i>	EGBMCL1291G04.g	gil130940	5e ⁻⁴¹
PR-2 Beta-1,3-glucanase	<i>Prunus persicae</i>	EGEQST2201A05.g	gil16903144	2e ⁻¹⁴²
PR-2 Beta-1,3-glucanase	<i>Hevea brasiliensis</i>	EGEQRT5001D04.g	gil4469115	3e ⁻¹⁰⁷
PR-2 Beta-1,3-glucanase precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGBFSL1080G08.g	gil21554264	4e ⁻⁷⁹
Beta-glucan binding protein (GEBP)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	EGEZST2207F06.g	gil6625560	8e ⁻⁹⁰
Beta-glucan binding protein (GEBP)	<i>Glycine max</i>	EGEZST2207F06.g	gil5019452	1e ⁻¹⁰²
PR-3- chitinase	<i>Vitis vinifera</i>	EGEQFB1001F10.g	gil10880381	1e ⁻¹²¹
PR-3 Class I	<i>Gossypium hirsutum</i>	EGMCST2239D03.g	gil42057411	1e ⁻¹⁴²
PR-3 Class I	<i>Gossypium hirsutum</i>	EGEQRT5001D01.g	gil42057411	1e ⁻¹⁵⁸
PR-3 Class I	<i>Arabis holboelli</i>	EGEQRT5002A03.g	gil77986321	2e ⁻¹⁰²
PR-3 Class IIa	<i>Gossypium hirsutum</i>	EGEQFB1001F10.g	gil74353511	1e ⁻¹²⁴
PR-3 Class IV	<i>Daucus carota</i>	EGEZST7212C03.g	gil74353711	3e ⁻¹²⁰
PR-3 Class V	<i>Nicotiana tabacum</i>	EGEQRT3300H12.g	gil505267	3e ⁻¹⁴²
PR-4 Class I	<i>Vitis vinifera</i>	EGMCST2237F11.g	gil3511471	5e ⁻¹³⁷
PR-5 thaumatin-like protein	<i>Helianthus annuus</i>	EGEQRT5002e12.g	gil20385169	4e ⁻¹⁰³
PR-5 thaumatin-like protein	<i>Zea mays</i>	EGJECL2209E10.g	gil444344	1e ⁻³⁵
PR-6 cysteine proteinase inhibitor	<i>Glycine max</i>	EGEQFB1001F12.g	gil1944319	2e ⁻⁸¹
PR-6 cysteine proteinase inhibitor	<i>Oryza sativa</i>	EGEQST6002D02.g	gil6721552	1e ⁻⁷⁸
PR-7 aspartic proteinase	<i>Nepenthes alata</i>	EGEZST2207H05.g	gil12231174	0.0
PR-7 oryzasin	<i>Oryza sativa</i>	EGEZSL4258G07.g	gil2130068	1e ⁻¹¹⁴
PR-7 Aspartic Proteinase	<i>Oryza sativa</i>	EGABFB1099H07.g	gil82458	1e ⁻¹⁰²
PR-8 Class III (chitinase)	<i>Oryza sativa</i>	EGJELV2266H01.g	gil27817953	1e ⁻¹⁰⁶
PR-8 Class III	<i>Fragaria x Ananassa</i>	EGJELV2266H01.g	gil45306071	4e ⁻⁹⁸
PR-9 Peroxidase, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGEQRT3201E09.g	gil15239370	3e ⁻¹³⁹
PR-9 Peroxidases	<i>Oryza sativa</i>	EGEQCL1341G06.g	gil7242902	1e ⁻¹⁰²
PR-9 Peroxidases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EGEQCL1341G06.g	gil10177520	2e ⁻¹⁰⁶
PR-9 Peroxidases	<i>Triticum aestivum</i>	EGEZFB1045A11.g	gil2117619	6e ⁻⁸¹
PR-10 Ribonuclease-like proteins	<i>Castanea sativa</i>	EGEQCL1200H04.g	gil16555781	1e ⁻⁵³
PR-10 Ribonuclease-like proteins	<i>Vitis vinifera</i>	EGEQSL1050E09.g	gil11182124	2e ⁻⁴⁶
PR-10 Ribonuclease-like proteints	<i>Sorghum bicolor</i>	EGEQCL1500C08.g	gil1408222	7e ⁻²⁰

PR-2: The PR-2 can act direct or indirect against pathogens: directly by degrading cell wall glucan of the pathogen, the major wall component of many pathogenic fungi (55); indirectly by promoting the release of oligosaccharides from cell walls of the pathogen, which can act as elicitors of defense reactions (8). PR-2 corresponds to β -1,3-glucanases (glucan

endo β -1,3 glucosidases) able to catalyze endo-type hydrolytic cleavage of β -1,3-D-glucosidic linkages in β -1,3- glucans. The β -1,3-glucanases (β Glu) proteins are abundant and they are implicated in plant defense mechanism functions as well as in several physiological processes of healthy plants.

PR-2 proteins are classified in three different structural classes (32):

a) Class I β Glu I comprise basic protein localized in the cell vacuole and which accumulates at higher concentrations in the roots and in lower levels in mature leaves of healthy tobacco plants.

b) Classes β Glu II and β Glu III are secreted into the extracellular space.

We founded four clusters with high similarity, these clusters of the PR-2 or Beta-1,3-glucanase family with similarity with proteins of the *Fragaria X Ananassa*, *Prunus persica*; *Hevea brasiliensis*, and *A. thaliana* (Table 5).

PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 (Chitinases): Chitinases are ubiquitous enzymes of bacteria, fungi, animals and plants. They hidrolise the β -1,4-linkage between *N*-acetylglucosamine residues of chitin, a structural polysaccharide of the cell wall of many fungi.

PR-3: Among the PR-3 subgroup there are many classes of chitinase and all of them have chitin-binding domain (CBD). The family class is classified according to homologous sequences and presence/absense of a particular binding site. Six classes of PR-3 have been described based on amino acid sequence homology: classes I, II, IV, V, VI and VII (37). Most chitinases class I have a C-terminal propeptide that is necessary for their targeting to the vacuole. Were founded seven clusters with high similarity to PR-3 chitinases in the FORESTS bank (Table 5). Four *Eucalyptus* clusters were similar to chitinase class I from *Gossypium hirsutum* and *Arabidopsis thaliana*, one cluster was similar to class IIa chitinase from *Gossypium*

hirsutum and other to class IV chitinase from *Daucus carota*. The class I chitinases are associated with the biochemical defense of plants against potential pathogens (10). Class IIa chitinase is pathogen-induced and according to Huynh et al. (20), this chitinase showed greater antifungal activity when tested in vitro for antifungal activity against the growth of *Trichoderma reesei*, *Alternaria solani*, and *Fusarium oxysporum*. Class IV chitinases also are pathogen induced, as well as induced by salicylic acid treatment and they were expressed during leaf senescence in *Brassica napus* (18).

Among the *Eucalyptus* clusters, three were analyzed according similarity to predict amino acids to classes I, II and IV of PR-3 from dicots. Two clusters showed twenty-one amino acids absence at N-terminal region what represents signal region, and they present stop codon at C-terminal region. The predict amino acids of these clusters aligned to class I chitinase from cotton at 75-78% of similarity. The predict amino acid sequences of these *Eucalyptus* clusters contain cysteine-rich N-terminal domains with eight conserved cysteine residues that are essential for chitin binding (45) or improving the chitin-hydrolyzing activity of the chitinases (56). Another *Eucalyptus* cluster was similar to class IV chitinase with the translational start site of the major open reading frame (ORF) and stop site. The nucleotide sequence of cDNA encodes a predicted 274-amino acid protein containing 81% of conserved amino acids for a *Daucus carota* class IV chitinase. This *Eucalyptus* cluster contains cysteine-rich N-terminal domains, which is smaller due to deletions when compared with class I chitinases. The *Eucalyptus* cluster also possessed the amino acid Tyr-182, what is the active site of the predict class IV chitinase protein (20).

PR-4: This family is divided in two classes, I and II. The class I is represented by hevein, a small anti fungal protein found in *Hevea brasiliensis* (52). The hevein has three-dimension

structure is similar to domains of wheat-germ agglutinin and other cereal lectins. The precursor of sequence is high homologous to cDNA encoding wound-induced protein (hence called Win) of potato. The *Eucalyptus* database contains EST clusters homologous to class I PR-4 from *Vitis vinifera* (Table 5). Two clusters showed above 76% similarity to grapevine and barley seed basic protein, that present similarity with the proteins encoded by the wound-induced potato and rubber tree genes.

PR-8 and PR-11: PR-8 includes chitinases belonging to class III, which in their turn belong to the family 18 of glycosyl hydrolases (36). This pathogenesis related proteins were first described as lysozymes and were isolated from *Parthenocissus quinquefolia* and cucumber (34). They were also isolated from *Hevea brasiliensis* latex, as heveamine, a dual lysozyme and chitinase (21). In plants, PR-8 has been induced by pathogen infection in *Arabidopsis* (44), tobacco (30), barley (23), and cucumber (30) and, by wounding in cucumber (29).

The class III chitinase also can be induced by pathogen, such as example in *Cucubita maxima*, in which *Neurospora crassa* induced the expression of class III chitinase (25). Although the predict *Eucalyptus* proteins are full-length, they lack in their sequences the N-terminal cysteine-rich domain, predominant characteristic in class III chitinases in plants (25). The amino acid residues at the putative catalytic site of the plant class III chitinases, aspartic acid and glutamic acid, are present at amino acid positions 129 and 149 (aspartic acid) and, 133 and 153 (glutamic acid) in the *Eucalyptus* predict proteins similar to class III chitinases from rice and *Hevea*, respectively.

PR-11 was first isolated from tobacco (33) and it also belongs to family 18 of glycosyl hydrolases (36). This protein is induced by pathogen infection and shares very little sequence

homology with PR-8 and other plant chitinases, even though it presents the basic protein structure.

Were founded two clusters similar with chitinase class III (Table 5). One of this cluster was 80% similar to class III chitinase from *Oryza sativa* and less similar to classes of PR-3 chitinases. Another *Eucalyptus* cluster showed 81% of similarity to class III chitinase from *Fragaria x Ananassa*.

PR-5: PR-5 (thaumatin-like) proteins were first detected in acidic extracts of tobacco leaves infected with *Tobacco mosaic virus* (TMV) (40). Because of their high similarity to the sweet-tasting protein thaumatin from *Thaumatococcus daniellii*, these proteins were called thaumatin-like proteins (TLPs). Osmotin and NP24 are also related to thaumatin and accumulate in cultured tobacco and tomato cells, respectively, under osmotic stress. Since these two proteins are induced by pathogen infection, they also belong to the PR-5 family (47). It has been shown that TLPs have anti-fungal properties and are part of plants anti-fungal defenses (54). In the FOREST database there is a putative PR-5 similar to PR-5 of maize and sunflower (Table 5).

PR-6: proteinase inhibitors (PIs) were first isolated from seeds of Fabaceae, Poaceae, and Solanaceae (41). These are highly stable defensive proteins of plant tissues that are both developmentally regulated and induced in response to insect and pathogen attacks. PRs form structurally unrelated subclasses, with various regulations, affecting all kinds of proteolytic enzymes (serine-, cysteine-, aspartic-, and metallo-proteinases). Proteolytic enzymes are part of the virulence factor of pathogenic organisms and their inhibition may limit the availability of amino acid source for the invader among other effects. Proteinase inhibitor activity was described in a number of plant-pathogen interactions including viruses, bacteria and fungi

(11). The induction of PR-proteins by insect or other mechanical injury have been described for interaction with potato, maize, tomato, wheat and alfalfa. Five main factors can induce systemic expression of PRs: systemin, abscissic acid (ABA) or JA. Recently, the tomato pin2 (proteinase inhibitor 2) gene was shown to be ABA-independent for systemin induction. In the eucalypt EST database there are two clusters (EGJQFB1001F12.g and EGEQST6002D02.g) similar with *Glycine max* and *Oryza sativa*, respectively.

PR-7: One member of this family is an alkaline proteinase (PR-P69) and isoforms expressed in tomato after pathogen infection (22). Tobacco leaves were found to express, constitutively, an extracellular aspartyl-proteinase of 36-40kDa that cleaves PR proteins under acidic conditions, these proteinases may be involved in the regulation of PR proteins deactivation and recycling. In the FOREST database there are sequences similar to putative orizasin and aspartyl-protease precursor of rice (Table 5).

PR-9: Peroxidases are heme-containing glycoproteins that catalyze the oxidation by H₂O₂ of a wide range of organic and inorganic substrates. They occur in numerous isoforms in plants, animals, fungi and bacteria (17). In plants, peroxidases are key enzymes in the wall-building processes like polysaccharide cross-linking, cross-linking of extensin phenylpropanoid monomers and suberization. In addition, specific isoenzymes, similar to a lignin-forming peroxidase, were recognized as PRs in tobacco and were classified as PR-9 (47).

Considering the wide variety of known peroxidase genes, our efforts concentrated on finding EST clusters similar to driver sequences associated with pathogen interactions and related situations. We have found putative homologues to PR-9 of rice, wheat and Arabidopsis (Table 5) in the FOREST databank.

PR-10: The type member of this family is a protein isolated from parsley that shares structural homology with ribonucleases (46). Proteins of the PR-10 family seem to be ubiquitous in plants, with occurrence in several plant species. Allergens from birch pollen grains, apple, and celery share sequence homologies with PR-10 family and are also included in this class. PR-10 proteins accumulate around sites of pathogen entry and wounding, phytohormones (cytokinins, ABA, and ethylene) also induce production of PR-10 transcripts. PR-10 can be present in seeds, roots, stem, flowers and also in senescent leaves. In the FOREST we found two clusters similar to PR-10: *Vitis vinifera* and *Sorghum bicolor* (Table 5). The expressed sequence tag (EST) sequencing approach allows for analysis of expressed genes and has accelerated gene discovery. The establishment of putative functions through comparisons of ESTs with genes and sequences, whose functions have already known for the establishment of important defense mechanisms.

REFERENCE

1. Agrios, G.N. Plant Pathology. New York: Academic Press, 1997. 635p.
2. Alexander, D.; Goodman, R.M.; Gut Rella, M.; Glascock, C.; Weymann, K.; Friedrich, L.; Maddox, D.; Ahl Goy, P.; Luntz, T.; Ward, E.; Ryals, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein. 1a. Proc Natl Acad Sci USA 90: 1993.
3. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W And Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

4. Baker, B.; Zambryski, P.; Staskawicz, B.; Dinesh-Kumar, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276(5313): 726-733, 1997.
5. Bent, A.F.; Kunkel, B.N.; Dahlbeck, D.; Brown, K.L.; Schmidt, R.; Giraidat, J.; Leung, J.; Staskawicz, B.J. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a Leucine-rich repeat class of plant diseases resistance genes. *Science*, v.265, p.1856-60, 1994.
6. Bleichert, S.; Brodschelm, W.; Holder, S.; Krammerer, L.; Kutchan, T.M.; Muller, M.J.; Xiaz, Q.; Zenk, M.H. Octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.92, n.10, p. 4099-4105, 1995.
7. Boller, T. Antimicrobial functions of the plant hydrolases chitinase and β -1,3-glucanase. In: Fritig B, Legrand M, eds. *Developments In Plant Pathology*. pp. 391-400. 1993.
8. Bowles, J.D. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry*, 59:873-907, 1990.
9. Brederode, F.T.; Linthorst, H.J.M.; Bol, J.F. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Molecular Biology*, 17 (6):1117-1125, 1991.
10. Chang, M. M., Horovitz, D., Culley, D.; Hadwiger, L. A. Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and the elicitor chitosan. *Plant Molecular Biology*, 28:105-111. 1995.
11. Cordero, M.J.; Raventós, D.; San Segundo, B. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant Journal*, 6 (1):141-150, 1994.

12. Dixon, R. A. & Lamb, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, p.339-367, 1990.
13. Ecker, J.R. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, 268(1):667-675, 1995.
14. Feuillet, C.; Schachermayr, G.; Keller, B. Molecular cloning of a new receptor-like kinase genes encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. *The Plant Journal*, 11 (1): 45-92, 1997.
15. Flor, H.H. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Journal Agricultural Research*, 73:335-337, 1946.
16. FORESTs - Eucalyptus ESTs Genome Sequencing Project Consortium. Disponível em: <<https://forest.esalq.usp.br>>. Acesso em: 24 de Outubro de 2007.
17. Gaspar, T.; Penel, C.; Thorpe, T.; Greppin, H. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Geneve: University of Geneva Press, 324p. 1982.
18. Hanfrey, C.; Fife, M.; Buchanan-Wollaston, V. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant. Mol. Biol.* 30: 597-609. 1996.
19. Hillier, L.; Lennon, G.; Becker, M.; Bonaldo, M.F.; Chiapelli, B.; Chissoe, S.; Deitrich, N.; Dubuque, T.; Favello, A.; Gish, W. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. *Genome Research*, 6(9):807-828, 1996.
20. Huynh, Q. K.; Hironaka, C. M.; Levine, E. B.; Smith, C.E.; Borgmeyer, J. R.; Shah, D. M. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *J. Biol. Chem.* 267: 6635-6640. 1992.

21. Jekel, P.A.; Hartmann, J.B.H.; Beintema, J.J. The primary structure of hevamine, and enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *Eur. J. Biochem.* 200 : 123. 1991.
22. Jorda, L.; Coego, A.; Conejero, V.; Vera, P. A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4):2360-2365, 1999.
23. Kragh Km, Jacobsen S, Mikkelsen Jd, Nielsen Ka (1993) Tissue specificity and induction of class I, II, III chitinases in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant*, 89: 490–498
24. Kieber J.J.; Rothenber,G.M.; Roman, G.; Feldmann, K.A.; Ecker, Jr. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441. 1993.
25. Kim, M. G.; Lee, K. O.; Cheong, N. E.; Choi, Y. O.; Jeong, J. H.; Cho, M. J.; Kim, S. C.; Lee, S. Y. Molecular cloning and characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. *Plant Sci.* 147: 157-163. 1999.
26. Kolattukudy, P.E. Cutin, suberin and waxes. In: *The biochemistry of plants*. Academic Press, pp. 571-635. 1980.
27. Kuc, J. Induced systemic resistance to plant disease and phytointerferons – are compatible? *Fitopatologia brasileira*, 10 (1): 17-40, 1985.
28. Kuramae, E.E.; Fenille, R.C.; Rosa Jr., V.E.; Rosa, D.D.; Monteiro, J.P.; Gimenes, M.A.; Palmieri, D. A.; Lima, M.M.; Fávoro, R.D. Mining of sugarcane ESTs involved in the mechanisms against plant pathogen and environmental stress. *Summa Phytopathologica*, 28:315-324, 2002.

29. Lawton, K.A.; Beck, J.; Potter, S.E.; Ward, A.C.; Ryals, J. Regulation of cucumber class III chitinase gene expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7 : 48. 1994.
30. Lawton, K.; Ward, E.; Payne, G.; Moyer, M.; Ryals, J. Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. *Plant Mol. Biol.* 19: 735-739. 1992.
31. Mcgonigle B.; Lau, S.C.; Jennings, L.D.; O'Keefe, D.P. Homogluthathione selectivity by soybean glutathione S-transferase. *Pest. Biochem. And Physiol.* 15-25, 1998.
32. Meins, F., Jr.; Neuhaus, J.M.; Sperisen, C.; Ryals, J. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In: Boller, T., Meins Jr., F. (Eds.) *Genes involved in plant defense.* Vienna: Springer-Verlag, p.245-282. 1992.
33. Melchers, L. S.; Apotheker-De Groot, M.; Van Der Knaap, J.; Ponstein, A. S.; Sela-Burlage, M. B., Bol, J. F., Cornelissen, B. J. Z.; Van Den Elzen, P. J. M.,; Linthorst, H. J. M. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.* 5:469. 1994.
34. Métraux, J.P.; Ahl Goy, P.; Staub, T.; Spelch, J.; Steinemann, A.; Ryals, J.; Ward, E. Induced resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: Hennecke, H. & Verma, D.P.S. (Eds). *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, v.1. pp.432-439. 1991.
35. Neiman, A.M. Conservation and reiteration of a kinase cascade. *Trends genetics*, 9:390-394, 1993.
36. Neuhaus, J-M. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In: Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.) *Pathogenesis-related proteins in plants.* New York: CRC Press, p.77-105. 1999.

37. Ohme-Takagi, M. & Shinshi, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7(2):173-182, 1995.
38. Payne, G.; Middlesteadt, W.; Desai, N.; Williams, S.; Dincher, S.; Carnes, J.; Ryals, J. Isolation and sequence of a genome clone encoding the basic form of pathogenesis-related protein 1 from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*. 12(5): 595-596.1989.
39. Parker, J.E.; Coleman, M.J.; Szabò, V.; Frost, L.N.; Schmidt, R.; Van Der Biezen, E.A.; Moores, T.; Dean, C.; Daniels, M.J.; Jones, J.D.G. The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell*, 9(6):879-894, 1997.
40. Pierpoint, W.S.; Tatham, A.S.; Pappin, D.J.C. Identification of the virus-induced protein of tobacco leaves that resembles the sweet-tasting protein thaumatin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31(1):291-298, 1987.
41. Ryan, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28:425-449, 1990.
42. Scandalios, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiol*. 101:7-12. 1993.
43. Sharan, M.; Taguchi, G.; Gonda, K.; Jouke, T.; Shimosaka, M.; Hayashida, N.; Okasaki, M. Effects of methyl jasmonate and elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. *Plant Science*, 132(1):13-19, 1998.
44. Samac, D. A.; Shah, D. M. 1991 Developmental and pathogen induced activation of the Arabidopsis acidic chitinase protein. *Plant Cell* 3:1063-1072

45. SHINSHI, H.; NEUHAUS, J. M., RYALS, J.; MEIN, F. Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase gene can arise by transposition of sequence encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol. Biol.* 14: 357-368. 1990.
46. Sikorski, M.M., Biesiadka, J., Kasperska, A.E., Kopcinska, J., Lotocka, B., Golinowski, W., Legocki, A.: Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules.-*Plant Sci.* 149: 125–137, 1999.
47. Stintzi, A.; Heitz, T.; Prasad, V.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Kauffmann, S.; Geoffroy, P.; Legrand, M.; Fritig, B. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(3):687-706, 1993.
48. Suzuki, K.; Suzuki, N.; Ohme-Takagi, M.; Shinshi, H. Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting. *Plant Journal*, 15(5):657-665, 1998.
49. Sweigard, J.A; Chunley, F.G.; Valent, B. Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 232:183-190, 1992.
50. Uchiana, T. & Okuyama, K. Participation of *Oryza sativa* leaf wax in appressorium formation by *Pyricularia oryzae*. *Phytochemistry*, 29:91-92, 1990.
51. Van Loon, L.C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. (Eds.) *Pathogenesis-related proteins in plants*. New York: CRC Press, p.1-19. 1999.
52. Van Parijs, J.; Broekaert, W.F.; Peumans, W.J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183(1):258-264, 1991.

53. Verberne, M.C.; Verpoorte, R.; Bol, J.F.; Mercado-Blanco, J.; Linthorst, H.J.M. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*, 18(2):779-783, 2000.
54. Vigers, A.J.; Roberts, W.K.; Selitrennikoff, C. P. A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(2):315-323, 1991.
55. Wessels, J.G.H.; Sietsma, J.H. Fungal cell walls: a survey. In: Tanner, W., Loewus, F.A. (Eds.) *Encyclopedia of plant physiology. Plant Carbohydrates II*. Berlin: Springer Verlag, 352p. 1981.
56. Yamagami, T. & Funatsu, G. Limited proteolysis and reduction carboxylmethylation of rye seed chitinase-?: role of the chitin-binding domain in its chitinase action. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 1081-1086. 1996

CAPÍTULO V

EXPRESSÃO DIFERENCIAL (“MACROARRAY”) DE GENES RELACIONADOS AO
METABOLISMO DE DEFESA DE EUCALIPTO, QUANDO INOCULADOS COM
Puccinia psidii E TRATADOS COM ACIBENZOLAR-S-METIL

Expressão diferencial (“macroarray”) de genes relacionados ao metabolismo de defesa de eucalipto, quando inoculados com *Puccinia psidii* e tratados com Acibenzolar-S-metil

Leonardo Pires Boava^{1,2}

¹ Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, CEP 18603-970, CP 237, Botucatu, SP ² Bolsita FAPESP

E-mail: leoboava@yahoo.com.br

Data de chegada: / / Aceito para publicação / /

RESUMO

Com o auxílio da técnica de ‘macroarray’ esse trabalho teve como objetivo verificar o padrão de expressão de ESTs, provenientes de bibliotecas de cDNA construídas pelo projeto Genoma do *Eucalyptus* - FORESTs (EUCALYPTUS GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORCIUM), relacionadas ao sistema de defesa do eucalipto quando inoculados com *Puccinia psidii* ou quando tratados com indutor de resistência Acibenzolar-S-metil. Para isso, mudas provenientes de clone suscetível e resistente a ferrugem (VR e C0, respectivamente) receberam tratamentos com Acibenzolar-S-metil cinco dias antes da inoculação artificial com o patógeno. Os resultados apontaram várias ESTs sendo induzidas, relacionadas ao fortalecimento da parede celular, polarização celular, acúmulo de proteínas-RP, enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, enzimas envolvidas na peroxidação de lipídios, acúmulo de compostos fenólicos, entre outras. Em plantas do clone C0, as ESTs apenas se mostraram induzidas ou reprimidas quando receberam o tratamento com Acibenzolar-S-metil e não quando foram inoculadas. Nas plantas do clone VR diversas ESTs envolvidas em vários

mecanismos de defesa se mostraram induzidas quando as plantas foram desafiadas pelo patógeno, quando apenas foram tratadas com o indutor de resistência ou em plantas previamente tratadas com indutor, seguida de inoculação com o patógeno.

Palavras-chave adicionais: *Eucalyptus*, resistência, fitoalexinas, Proteínas-RP.

ABSTRACT

Differential genes expression ("macroarray") related with metabolism of eucalyptus defence, when inoculated with *Puccinia psidii* and treated with Acibenzolar-S-methyl

Using macroarray method this work aimed to check the pattern of expression of ESTs, from cDNA libraries built by the *Eucalyptus* Genome Project - FORESTs (EUCALYPTUS GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORCIUM), related to the defence system of eucalyptus when inoculated with *Puccinia psidii* or when treated with inducing resistance Acibenzolar-S-methyl. For this seedlings susceptible and moderate resistant to rust (VR and C0, respectively) received treatments with Acibenzolar-S-methyl five days before artificial inoculation with the pathogen. The results showed several ESTs being expressed differently related to the strengthening of the cell wall, cell polarization, accumulation of protein-RP, enzymes involved in the route of phenylpropanoids, of enzymes involved in lipid peroxidation, accumulation of phenolic compounds. In plants of the clone C0 the ESTs just were expressed differently when receiving treatment with Acibenzolar-S-methyl and not when they were inoculated. In plants of the clone VR several ESTs involved in various mechanisms of defence were expressed differently when the plants have been challenged by the pathogen, when only were treated with the induction of resistance in plants or treated with inductor followed by inoculation with the pathogen.

Additional keywords: *Eucalyptus*, resistance, plant-signaling, phytoalexins, PR-proteins

INTRODUÇÃO

A área de florestas plantadas com eucalipto no Brasil em 2007 foi de 3.751.867 ha representando um crescimento de 202.719 ha em relação ao ano de 2006. Desse total, o Estado de Minas Gerais contribui com 1.105.961 ha, seguindo do estado de São Paulo com 813.372 ha e o estado da Bahia com 550.127 ha. (ABRAF, 2008). O sistema agroindustrial florestal, no segmento de florestas plantadas (primário e processamento industrial) em 2007 gerou aproximadamente 4,6 milhões de empregos incluindo diretos (656 mil) indiretos (1,8 milhões) e empregos resultantes do efeito-renda (2,1 milhões).

Com o decorrer do tempo e o aumento das áreas plantadas a cultura do eucalipto tem se mostrado suscetível à uma série de doenças, na sua maioria, provocada por fungos patogênicos desde a fase de viveiro até os plantios adultos (Furtado et al., 2008). Dentre elas a ferrugem causada por *Puccinia psidii* é uma das principais doenças do eucalipto no Brasil, provocando prejuízos em viveiro e no campo (Ferreira, 1989). No país a doença constitui um sério problema principalmente devido à ocorrência de condições ambientais favoráveis praticamente durante todo o ano. Desde 1973 perdas econômicas preocupantes, de até 100%, tem sido registradas sobre espécies do gênero *Eucalyptus* (Aparecido et al., 2003).

Os fungos causadores de ferrugem são patógenos biotróficos, ou seja, são altamente especializados e utilizam o aparato celular do hospedeiro para poder se nutrir e se reproduzir. Como resultado o patógeno realiza uma infecção estável e causa danos no hospedeiro, porém não causa a sua morte (Mendgen & Hahn, 2002). Depois da germinação dos uredósporos da ferrugem sobre a superfície foliar, a hifa penetra na planta pela superfície íntegra e por aberturas estomatais. Uma vez dentro do tecido hospedeiro, um micélio

intercelular prolifera e produz o que se denomina haustório dentro das células da planta, o qual tem uma função fundamental na absorção de nutrientes, nos tecidos das plantas. (Kaiserslautern, 2005).

A resistência genética é apontada como a melhor opção para o controle da ferrugem do eucalipto, devido à existência de variabilidade no grau de resistência, tanto entre espécies de *Eucalyptus*, quanto entre procedências de uma mesma espécie Santos et al. (2001). A resistência pode também ser ativada em plantas suscetíveis após a infecção localizada por fitopatógenos ou em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sendo conhecida como 'indução de resistência' (Hammerschmidt & Dann 1997). O fenômeno da resistência induzida tem sido demonstrado em muitas espécies de plantas, onde vários estudos têm revelado a expressão de respostas de defesa contra vários e importantes agentes causais de doença vegetal, tais como vírus, fungos, bactérias e nematóides, cujos diferentes mecanismos têm sido estimulados por várias substâncias (Sobrinho, 2004).

Segundo Guzzo (2004) a resistência de plantas contra doenças está associada a um conjunto de respostas de defesa ativadas pelo hospedeiro após o contato com agentes patogênicos. A ativação dessas respostas em plantas depende da eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença de patógenos através de mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática e mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas. Como consequência desse processo, ocorre a ativação de fatores de transcrição no núcleo da célula vegetal, com a expressão subsequente de genes de defesa.

Vários projetos de estudo de transcriptoma (população de RNAs transcrita de um determinado organismo), vêm sendo conduzidos em diferentes espécies vegetais,

denominados projetos EST (*Expressed Sequence Tag* ou Etiqueta de Sequências Expressas), cuja metodologia consiste em poderosa ferramenta para identificar genes expressos em determinados tecidos e/ou tipos celulares de interesse (Nogueira, 2004). A partir destes projetos várias metodologias foram desenvolvidas para a análise da expressão diferencial de genes, como a técnica de macroarranjos ('macroarray'), que são empregadas para identificar genes envolvidos no processo de desenvolvimento das plantas e de resposta celular a uma variedade de estímulos químicos ou físicos. A tecnologia de macroarranjos constitui-se em uma poderosa ferramenta para o monitoramento simultâneo do perfil de expressão de muitos genes permitindo uma análise em larga escala dos fenômenos biológicos que ocorrem em células, tecidos ou organismos (Cox, 2001).

Com o auxílio da técnica de macroarranjo de cDNA esse trabalho teve como objetivo verificar o perfil de expressão de 192 clones, provenientes de bibliotecas de cDNA construídas pelo projeto Genoma do *Eucalyptus* - FORESTs (EUCALYPTUS GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORCIUM), relacionadas ao sistema de defesa do eucalipto quando inoculados com *P. psidii* ou quando tratados com indutor de resistência Acibenzolar-S-metil.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, tratamento com indutor de resistência e inoculação

Foram utilizadas mudas clonais de sessenta dias, provenientes de híbridos das espécies *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, denominadas 'Urograndis', gentilmente cedidas pela empresa Votorantim Celulose e Papel. De acordo com testes de resistência ao fungo *P. psidii* realizados no Setor de Defesa Fitossanitária/FCA/UNESP-Botucatu-SP, e através de índices de

incidência e severidade da doença proveniente de levantamentos realizados pela própria empresa, foram selecionados dois clones de reação resistência/suscetibilidade conhecida. Sendo assim, o clone C0 foi utilizado como padrão de resistência à ferrugem e o clone VR como padrão suscetibilidade.

O indutor de resistência Acibenzolar-S-metil (ASM), produto comercial Bion® 500WG (Syngenta), derivado do benzotiadiazol, um análogo do ácido salicílico, que tem sido amplamente estudado como agente indutor de resistência, foi pulverizado na dose de 50 ppm. Cinco dias após o tratamento com o indutor as plantas foram inoculadas com *P. psidii*. A obtenção do inóculo consistiu na coleta de uredósporos de *P. psidii* de plantas de eucalipto infectadas naturalmente no campo, em seguida foi preparado uma suspensão de 5×10^4 esporos/ mL, em água destilada contendo Tween 80 (0,05%). O método de inoculação consistiu na aplicação da suspensão na face dorsal das folhas com o auxílio de uma bomba de vácuo, e em seguida as plantas foram mantidas em câmara de crescimento à 21°C, fotoperíodo de 12 horas e com alta umidade relativa.

Delineamento experimental

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x2x2x4, considerando dois 2 clones (C0 e VR); inoculados e não inoculados com *P. psidii*; pulverizados com acibenzolar-S-metil e água destilada e imediatamente após a inoculação com o patógeno, se iniciou a coleta das folhas em 4 diferentes períodos: 0, 24, 48 e 72 horas. No momento da coleta as folhas foram envolvidas em papel alumínio e submersas em nitrogênio líquido, em seguida foram mantidas à -80 °C.

Extração de RNA total

Para as extrações de RNA foi utilizado o método do tampão CTAB, descrito por Chang et al. (1993), onde amostras de 0,5 g de folhas correspondendo a cada tratamento foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido com 10 ml de tampão de extração. A quantificação do RNA extraído foi feita em biofotômetro (NanoDrop-ND1000), na diluição de 1:10 (v/v). As medidas de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda de 260 e 280nm, utilizando-se água/DEPC para o ajuste inicial do aparelho (dados não apresentados). Para verificar a integridade das amostras 2 μ L de RNA total de cada amostra foi seco em bomba á vácuo e re-suspendido em 18,0 μ L de uma mistura composta por tampão de amostra, brometo de etídeo (10 mg/ mL) a água-DEPC. Esta mistura foi posteriormente aquecida em banho-maria a 65° C por 5 minutos antes da sua aplicação em gel de agarose 1,5% (p/v) contendo 6,7% de formaldeído (v/v). O gel foi submetido à eletroforese a 70 V constante por cerca de 50 minutos e, em seguida exposto à luz ultravioleta (UV) em trans-iluminador e sua imagem captada por uma câmera CCD (ESTAM KODAK COMPANY; Rochester, New York) (dados não apresentados).

Síntese de cDNA

Em tubo de microcentrífuga, foram adicionados: 4 μ g de RNA total; 1 μ L Oligo dT (dT₁₂₋₁₈, Invitrogen) 1 μ L dNTPs (ATGC) 10mM cada, perfazendo um volume final de 14 μ L. A mistura foi aquecida a 65 °C durante 5 minutos e, em seguida, colocada em gelo. Foram adicionados à reação: 4 μ L de tampão de primeira fita (5x, BRL), 2 μ L DTT (100mM), 1 μ L RNAGuard,. A mistura foi aquecida a 42°C por 2 minutos, e então se adicionou 1 μ L da enzima Superscript II (BRL, 200U/ μ L), prosseguindo-se com rápida centrifugação em microcentrífuga e incubação a 42 °C por 50 minutos. Após esse período a reação foi inativada

a 70°C por 15 minutos. Para remover o RNA complementar ao cDNA adicionou-se 1 µl (2 unidades) de *E. coli* RNase H e incubou-se a 37° C por 20 minutos. A purificação das amostras de cDNA foram realizadas através do Kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) de acordo com as recomendações do fabricante, partindo de 5 µg de cDNA.

Seleção das ESTs (Expressed Sequence Tag)

Foi utilizado DNA plasmidial de clones ESTs provenientes de bibliotecas de cDNA construídas pelo projeto Genoma do *Eucalyptus* - FORESTs (EUCALYPTUS GENOME SEQUENCING PROJECT CONSORCIUM) que agrupa quatro das maiores companhias da área de papel e da celulose do Brasil, junto com o ONSA-AEG da FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que possui 123.889 ESTs de tecidos diferentes, incluindo plantas jovens (SD), raiz (RT), madeira (WD), casca (BK), calos (CL), folhas (LV), os internódios da haste (ST), seedlings (SL).

A busca foi feita usando um valor de ponto inicial descrito na ferramenta de busca de alinhamento (BLASTp), considerando e-value da faixa -10 e -53. As sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) foram usadas como “driver” para análise e alinhamento pelo programa TBLASTN (Altschul et al., 1997) em contraste aos conjuntos de ESTs obtidos pelo FOREST. Uma vez que um conjunto correspondente foi obtido, fez-se o alinhamento pelo programa BLAST X, com a proteína da NCBI, para verificação da seqüência. Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos foram construídos usando o Clustal X (v.1.81) um programa múltiplo de alinhamento de seqüências (Thompson et al., 1997) usando o método de agrupamento dos vizinhos mais próximos (Bol et al., 1990; Sticher et al., 1992). Identificou-se os grupos de seqüências de cDNA similares a

outras moléculas já conhecidas, como moléculas de plantas com função sinalizadora, fitoalexinas e vias de biossíntese de lignina, proteínas-RP e supostos genes correspondendo às enzimas envolvidas na detoxificação de moléculas de oxigênio reativo, entre outros.

Preparação das membranas para macroarranjo

As membranas foram confeccionadas junto ao Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCC Center)- UNESP-Jaboticabal. Para a preparação das membranas foi utilizado DNA plasmidial de 192 clones ESTs que foram obtidos por meio de micro-preparação, realizada através de lise alcalina em placas de 96 poços. Todos os clones foram re-sequenciados para confirmar a identidade do inserto.

As amostras de DNA plasmidial foram transferidas para membranas de náilon de 85 x 125 mm, carregadas positivamente (Genetix), utilizando-se um sistema robotizado (Q-BOT-GENETIXUK) do BCC. As amostras foram depositadas em quadruplicada, com espaçamento de 900 micras entre cada ponto, num arranjo 3X3, perfazendo um total de 768 pontos por membrana. Após a transferência do DNA, as membranas foram submetidas a tratamento em solução de desnaturação (NaCl 1,5M e NaOH 0,5M) e de neutralização (NaCl 1,5M e Trizma 1M) por 5 e 10 min., respectivamente e, posteriormente, fixou-se o DNA à membrana por radiação com luz UV (1600 joules) em aparelho Ultraviolet Crosslinker (CL1000, UVP), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix, UK).

Metodologia de marcação com quimiluminescência e hibridização

Em alternativa a marcação radioativa foi realizada marcação por quimiluminescência através da enzima fosfatase alcalina, o que permitiu maior agilidade na conclusão do experimento, maior segurança devido ao não manuseio com material radioativo, além de redução no custo do projeto. Para isso foi utilizado o kit de marcação AlkPhos

Direct™ (GE-Healthcare), seguindo as instruções do fabricante com algumas modificações para otimização da técnica de marcação.

Antes da pré-hibridação as membranas foram colocadas em solução em ebulição de SDS 0,1% durante 5 minutos. A pré-hibridação das membranas foi realizada em forno Hybaid, modelo H9360 (Hybaid Instruments, Holbrook, NY). Ao tampão de hibridação, fornecido pelo kit, foi adicionado 0,5 M NaCl e 4% (w/v) de reagente de bloqueio (fornecido pelo Kit) e deixado sobre gentil agitação durante 2 horas. Em seguida essa solução foi pré-aquecida a 55°C e colocada em garrafas de hibridação juntamente com as membranas por 2 horas, equivalente a 0,25 ml de solução/cm² de membrana. À solução tampão de hibridação utilizada para a pré-hibridação foi adicionado o cDNA marcado na proporção de 10ng/ml de tampão, permanecendo por 16 horas à 50°C.

Após a hibridação, procedeu-se a lavagem das membranas para retirada das hibridações inespecíficas que possivelmente tenham ocorrido. A lavagem foi realizada seguindo as instruções do fabricante, também com testes de temperaturas para melhores resultados. Após as lavagens foi retirado o excesso dos tampões de lavagens, e colocado 30-40 ul de reagente de detecção CDP-Star (GE-Healthcare) e deixado por 3 a 5 minutos, após retirada do excesso as membranas foram plastificadas e expostas em filme revelação Hyperfilm™ ECL (GE-Healthcare) com 1 hora e 30 de minutos de exposição. A revelação foi realizada com Fixador e Revelador GBX (KodaK). As imagens foram captadas com auxílio de um scanner (HP Photosmart C3180) e foram convertidas em extensão '.TIFF' monocromática 16 bits.

Análise dos macroarranjo e análises estatísticas

Os sinais obtidos das imagens foram quantificados usando-se o software BZScan (<http://tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/bzscan/>). Para as análises foram utilizados as emissões brutas dos pontos sem subtrair o valor da emissão de fundo local (“background”). Os dados relativos à emissão bruta dos pontos foram exportados para uma planilha do programa MS Excel (Microsoft, Redmond, WA).

Em seguida os dados foram exportados para um arquivo texto delimitados por tabulação, o qual foi importado para o programa estatístico R (R Development Core Team, 2005; Ihaka & Gentleman, 1996) e procedido às análises utilizando programas desenvolvidos pelo projeto Bioconductor (Gentleman, 2004).

Para tornar possível a comparação entre os macroarranjos, com o auxílio do pacote vsn (Huber, 2002) pertencente ao projeto Bioconductor foi realizado a estabilização das variâncias e uma normalização dentro e entre as membranas. O controle de qualidade foi investigado por meio de gráficos estatísticos apropriados, sendo eles: diagrama de caixas (boxplots) e histograma de frequências relativas. Os genes diferentemente expressos foram identificados com base nos valores do ‘Fold Change’ que é a razão (R) entre o valor obtido para um determinado tratamento pelo valor obtido para o seu respectivo controle para um dado gene. Genes com R de $\geq 1,5$ ou $\leq 0,6$ foram considerados induzidos ou reprimidos, respectivamente.

RESULTADOS

Normalização dos dados

Para tornar possível a comparação entre os macroarranjos, a normalização foi aplicada aos dados utilizando o pacote vsn/R. O controle de qualidade foi investigado por meio de gráficos estatísticos apropriados, sendo eles: histograma de freqüências relativas e diagrama de caixas (boxplots).

Nesta etapa é feito o ajuste das intensidades de cada hibridização individualmente, para que comparações posteriores possam ser feitas. Existem várias razões pelas quais a normalização precisa ser feita como, por exemplo, a colocação de quantidades diferentes de cDNA inicial nas membranas e erros sistemáticos ao medir os níveis de expressão. Na Figura 15 é possível observar que os dados apresentaram-se dentro de uma distribuição normal depois de normalizados. Na figura 16 é possível visualizar os Box-Plots dos dados antes e após a normalização.

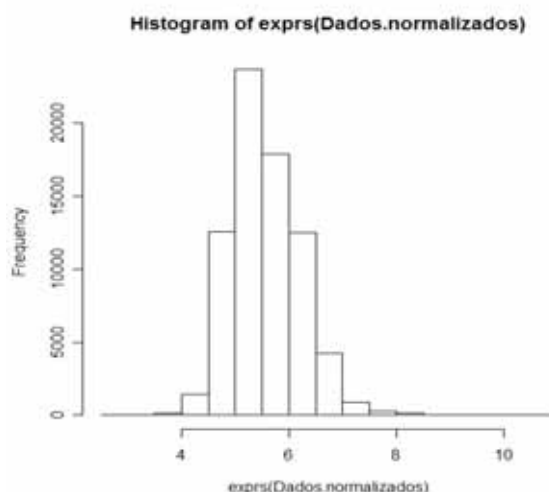


Figura 15. Histograma das freqüências relativas de todos os dados após normalização pelo método vsn R indicando que se aproximam de uma distribuição normal.

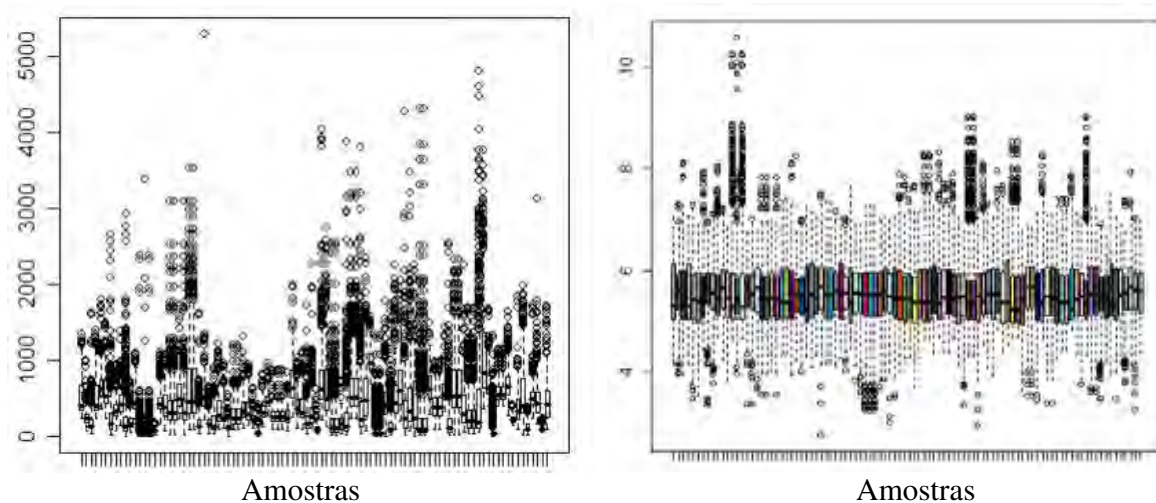


Figura 16 Diagrama de caixas (boxplots) de todos os dados normalizados antes e após a normalização pelo pacote vsn do programa R

Expressão gênica após inoculação com *Puccinia psidii*

O padrão de expressão gênica entre os clones C0 (de moderada resistência) e VR (suscetível) não foi similar, considerando os genes diferentemente expressos que apresentaram razão do “fold change” de $\geq 1,5$ ou $\leq 0,6$ (induzidos ou reprimidos, respectivamente). De um total de 192 ESTs distribuídas nas membranas de macroarranjos, 25 (13,02%) mostraram alterações no padrão de expressão nas diferentes condições que foram submetidas às plantas do clone VR, sendo 18 induzidas e 7 reprimidas (Tabela 1). Entre as plantas do clone C0, 4 ESTs (2,08%) se mostraram com diferenciada, sendo 3 induzidas e 1 reprimida. Entretanto, a diferenciação de expressão de algumas dessas não pode ser atribuída à presença do patógeno, visto que algumas também se mostraram induzidas ou reprimidas nas plantas que não foram inoculadas.

Tabela 1. Expressão diferencial de genes do clone VR (Suscetível a ferrugem do eucalipto) quando inoculado com *Puccinia psidii*

Identificação	Descrição	Fold Change tratamento /controle (VR s/inoc 0 hora)							
		0 hora Inoc	24 horas		48 horas		72 horas		
			s/inoc	Inoc.	s/inoc	Inoc.	s/inoc	Inoc.	
<u>INDUZIDOS</u>									
EGLV2206B11.g	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	1,42	1,40	1,75*	1,40	1,12	1,45	1,43	
EGRT3148F09.g	Acetil coa carboxilase	1,36	1,51*	1,42	1,80*	1,72*	1,77*	1,40*	
EGRT3319H04.g	Atgols1 galactinol synthase	1,66*	1,65*	1,68*	1,86*	1,55*	1,76*	1,70*	
EGST2013D06.g	Atgols1 galactinol synthase	1,58*	1,86*	2,08*	1,42	1,46	1,04	1,42	
EGLV1201F10.g	Catalase / enzima de desintoxicação	1,93*	1,45	2,16*	1,27	1,32	1,26	1,26	
EGSL1116C05.g	Déficit hídrico	1,37	1,51*	1,59*	1,27	1,27	1,36	1,11	
EGST2233B11.g	Glutathiona S-Transferase	2,68*	1,30	2,13*	1,21	2,38*	1,44	1,44	
EGFB1202C07.g	Glutathiona S-Transferase	2,22*	1,21	2,65*	1,16	1,44	1,07	1,42	
EGLV1202D12.g	Lipoxygenase	1,40	1,39	3,15*	1,22	3,33*	1,12	3,53*	
EGST2080D02.g	Morte celular programada	1,89*	1,34	2,69*	1,21	1,18	1,14	1,51*	
EGST6202C05.g	Morte celular programada	1,94*	0,97	2,56*	0,85	0,97	0,94	0,78	
EGST6257E07.g	Peroxidase	1,04	1,09	1,56*	1,08	1,01	1,05	0,72	
EGRT3312E05.g	Peroxidase	0,83	1,14	1,87*	1,05	2,82*	0,91	0,95	
EGSL5065E07.g	Phenylalanine ammonia lyase - PAL	0,96	0,85	2,01*	0,80	1,08	0,95	1,09	
EGLV2266H01.g	PR III Quitinase	1,07	1,05	2,31*	1,11	1,00	1,06	1,00	
EGST2201A05.g	PR II β -1,3-Glucanase	0,93	1,03	2,84*	0,97	2,98*	0,95	1,67*	
EGFB1039E04.g	Superoxido Dismutase	1,59*	1,45	1,80*	1,36	1,54	1,31	1,52	
EGRT3143E07.g	Tubulina b	0,86	1,26	3,35*	1,10	2,11*	1,07	1,05	
<u>REPRIMIDOS</u>									
EGRT3001E07.g	4- coumarate-coa ligase	0,94	0,99	1,04	0,88	0,37*	0,88	0,94	
EGCL1327C07.g	Enzima de desintoxicação	0,92	0,49*	0,83*	0,95	0,93	0,85	0,90	
EGST2002C02.g	Hidroxyphenylpyruvate dioxygenase	0,86	0,47*	0,48*	1,02	0,90	0,97	0,88	
EGSL1048B09.g	Isopentenyl pyrophosphate isomerase	0,90	0,41*	0,92	0,90	0,53*	0,89	0,89	
EGRT3123D01.g	Phospholipid Hydroperoxidase glutathione	0,88	0,55*	0,50*	0,97	0,80	0,95	0,94	
EGFB1021A07.g	PTGS	1,02	0,48*	0,62*	1,17	1,03	1,16	1,12	
EGST7267C07.g	PTGS	1,15	0,52*	0,57*	1,06	1,14	1,16	1,08	

*Genes diferentemente expressos de acordo o fold change $\geq 1,5$ ou $\leq 0,6$ induzidos ou reprimidos, respectivamente.

Tabela 2. Expressão diferencial de genes clone C0 (Moderadamente resistente a ferrugem do eucalipto) quando inoculado com *Puccinia psidii*

Identificação	Descrição	Fold change tratamento /controle (C0 s/inoc 0 hora)							
		0 hora inoc		24 horas s/inoc		48 horas inoc		72 horas s/inoc	
INDUZIDOS									
EGRT6013E03.g	Isoflavone reductase	1,41	1,38	1,44	1,39	1,45	1,88*	1,99*	
EGSL4258C07.g	PR 7 oryzanin	1,22	1,39	1,40	1,75*	1,53*	1,78*	1,79*	
EGCL1327C07.g	Enzima de desintoxicação	1,39	1,54*	1,62*	1,15	1,40	1,50*	1,59*	
REPRIMIDOS									
EGST2236C12.g	Geranilgeranil pirofosfato sintase	0,83	0,97	0,99	0,48*	0,59*	0,98	0,87	

*Genes diferentemente expressos de acordo o fold change $\geq 1,5$ ou $\leq 0,6$ induzidos ou reprimidos, respectivamente.

As ESTs que se mostraram induzidas nas plantas do clone C0 estão relacionadas com a isoflavone reductase (EGRT6013E03.g), com a enzima de desintoxicação (EGCL1327C07.g) e com uma PR 7 oryzanin (EGSL4258C07.g); e a EST geranilgeranil pirofosfato sintase (EGST2236C12.g) que se mostrou reprimida. Entretanto, apesar de se mostrarem diferentemente expressas em relação ao controle, não foi observado que as diferenças tiveram relação com a presença do patógeno, visto que foram induzidas ou reprimidas mesmo na ausência desse (Tabela 2).

Nas plantas do clone VR foram encontradas ESTs com comportamento diferenciado após serem inoculadas com *P. psidii* (Tabela 1). Dentre as ESTs que atuam na polarização celular e fortalecimento da parede celular foi possível identificar a tubulina (EGRT3143E07.g) que foi induzida 24 e 48 horas após inoculação (Tabela 1). Com relação a enzimas reguladoras que podem desintoxicar a célula de espécies ativas em oxigênio foram identificadas uma EST relacionada com a enzima superóxido dismutase (EGFB1039E04.g) que por sua vez está relacionada a explosão oxidativa, sendo um dos primeiros eventos na

interação planta-patógeno, induzida 24 horas após inoculação e a catalase (EGLV1201F10.C) que é uma enzima de desintoxicação que converte o H_2O_2 em O_2 , sendo induzida 0 e 24 horas após inoculação. Além da catalase, duas ESTs referentes a enzimas antioxidantes como a glutationa-S-transferase (EGST2233B11.g e EGFB1202C07.g) foram induzidas 0, 24, 48 horas após inoculação (Tabela 1). Ainda em relação à reação de hipersensibilidade duas ESTs (EGST2080D02.g e EGST6202C05.g) envolvidas na morte celular programada também se mostraram induzidas 24 e 48 horas após inoculação com o patógeno.

Referente às proteínas relacionadas com a patogenicidade também foram encontradas algumas ESTs com comportamento diferenciado nas plantas do clone VR após inoculação (Tabela 1), dentre elas RP II β -1,3-glucanase (EGST2201A05.g) induzida 24, 48 e 72 horas após inoculação, que atua na degradação da parede celular do fungo e na liberação de elicitores; a PR III Quitinase (EGLV2266H01.g) induzida 24 horas após inoculação que também atua na degradação da parede fúngica e na liberação de elicitores; além de duas ESTs relacionadas a peroxidase (EGST6257E07.g e EGRT3312E05.g) sendo induzidas 24 e 48 horas e 24 horas após inoculação, respectivamente, que estão diretamente ligadas à lignificação dos tecidos a qual polimeriza lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos (Pascholati & Leite 1995). Em relação à peroxidação de lipídios, a lipoxigenase (EGLV1202D12.g) se mostrou induzida 24, 48, horas após inoculação com *P. psidii* (Tabela 1).

ESTs relacionadas às enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL) (EGSL5065E07.g) cuja participação resulta em compostos como fitoalexinas, foi induzida nas plantas do clone VR 24 horas após inoculação, ao passo que a EST relacionada com a 4-coumarate-coa-ligase (EGRT3001E07.g) foi reprimida 48 horas após inoculação e uma EST relacionada com 9-cis-epoxicarotenoide-dioxigenase

(EGWD2252H08.g) que participa da biossíntese do ácido abscísico foi induzida 24 horas após inoculação.

Expressão gênica após tratamento com Acibenzolar-S-metil e inoculação com *Puccinia psidii*

Após tratamento com Acibenzolar-S-metil as plantas dos clones C0 e VR (moderadamente resistente e suscetível a ferrugem, respectivamente) não apresentaram um padrão de expressão gênica similar. Das 192 ESTs distribuídas nas membranas de macroarranjos, 21 (10,93%) apresentaram perfil diferenciado nas plantas do clone VR sendo 17 induzidas e 4 reprimidas (Tabela 3) e nas plantas do clone C0 foram encontradas 15 ESTs (7,81%) com perfil diferenciado, sendo que 12 se mostraram induzidas e 3 se mostraram reprimidas (Tabela 4).

Tabela 3. Expressão diferencial de genes do clone VR (Suscetível a ferrugem do eucalipto) quando tratado com Acibenzolar-S-metil (ASM) cinco dias antes inoculação com *P. psidii*

Identificação	Descrição	Fold change tratamento /controle (VR s/ASM; s/inoc ; 0 hora)							
		0 hora		24 horas		48 horas		72 horas	
		s/inoc	inoc	s/inoc	inoc	s/inoc	inoc	s/inoc	inoc
	INDUZIDOS								
EGRT3148F09.g	Acetil coa carboxilase	1,40	1,47	1,67*	1,45	1,57*	1,52*	1,22	1,41
EGRT3319H04.g	Atgols1 galactinol synthase	1,35	1,74*	1,75*	1,46	1,75*	1,70*	1,76*	1,71*
EGLV1201F10.g	Catalase	1,22	1,39	1,47	1,91*	1,47	1,43	1,32	1,29
EGRT3345C04.g	Crescimento	2,49*	2,48*	2,38*	2,38*	2,38*	2,40*	2,25*	2,34*
EGSL1048H11.g	Crescimento	1,85*	1,41	1,58*	1,91*	1,57*	1,43	1,44	1,52*
EGST6003C02.g	Farnesil transferase unid. A	1,42	1,41	1,40	1,19	1,40	1,47	1,38	1,53*
EGLV2299C03.C	Ferredoxina (fotossistema I)	1,43	1,40	1,58*	1,57*	1,52*	1,45	1,46	1,41
EGRT3300C12.g	Flavone-3-hydroxilase	1,39	1,72*	1,82*	1,72*	1,82*	1,37	1,46	1,48
EGST2233B11.g	Glutaciona S-Transferase	2,62*	2,53*	2,55*	2,66*	2,55*	2,44*	2,69*	2,24*
EGFB1202C07.g	Glutaciona S-Transferase	2,63*	2,74*	2,70*	2,76*	2,70*	2,79*	2,24*	2,69*
EGLV1202D12.g	Lipoxigenase	1,30	3,39*	1,36	3,46*	1,16	4,87*	1,47	1,05
EGST2080D02.g	Morte celular programada	1,28	1,98*	1,41	2,19*	1,01	1,67*	1,43	1,46
EGRT3312E05.g	Peroxidase	1,84*	1,78	2,05*	2,86*	1,08	1,13	1,03	1,07

EGSL5065E07.g	Phenylalanine ammonia lyase - PAL	2,00*	2,90*	2,07*	2,83*	1,07	1,03	0,99	0,98
EGLV2266H01.g	PR 8 class III (chitinase)	2,03*	2,13*	1,99*	1,85*	2,00*	2,05*	1,02	0,84
EGST2201A05.g	PR-2 beta- 1,3- glucanase	1,08	1,78*	1,07	2,65*	0,99	0,81	0,91	0,96
EGBK1051A06.g	Proteína quinase	1,43	0,97	1,99*	2,24*	0,95	1,02	0,83	0,94
<u>REPRIMIDOS</u>									
EGFB1017A05.g	Déficit hídrico	1,11	0,97	0,99	0,97	0,99	0,44*	0,99	0,95
EGSL8047C03.g	Glutamino sintetase	0,79	0,95	1,02	0,92	1,02	0,37*	0,96	1,02
EGSL1048B09.g	Isopentenyl pyrophosphate isomerase	0,88	0,92	0,51*	0,93	0,51*	0,93	0,77	0,93
EGSL1050E09.g	PR 10 ribonuclease-like proteins	0,53*	0,88	0,91	1,15	0,91	1,05	1,12	1,08

*Genes diferentemente expressos de acordo o fold change $\geq 1,5$ ou $\leq 0,6$ induzidos ou reprimidos, respectivamente.

Tabela 4. Expressão diferencial de genes do clone C0 (Moderadamente resistente a ferrugem do eucalipto) quando tratado com Acibenzolar-S-metil (ASM) cinco dias antes da inoculação com *P. psidii*

Identificação	Descrição	Fold Change tratamento/controle(C0 s/ASM; s/inoc ; 0 hora)							
		0 hora		24 horas		48 horas		72 horas	
		s/inoc	inoc	s/inoc	inoc	s/inoc	inoc	s/inoc	Inoc
<u>INDUZIDOS</u>									
EGRT3184D07.g	Crescimento	1,99*	1,98*	1,54*	1,77*	1,03	0,98	0,94	1,04
EGLV2299C03.g	Ferredoxina (fotossistema I)	2,03*	1,91*	2,01*	2,52*	1,55*	1,97*	0,99	0,87
EGRT3300C12.g	Flavone-3-hydroxilase	1,81*	1,98*	2,24*	1,17	1,28	1,18	1,59*	1,21
EGST6257E07.g	Glutathiona peroxidase	1,89*	1,75*	2,49*	2,54*	0,90	1,03	0,96	0,97
EGFB1202C07.g	Glutathiona-S-transferase	1,53*	2,54*	1,91*	1,96*	1,02	0,97	1,04	1,02
EGSL4281C09.g	Phenylalanine ammonia lyase PAL	2,10*	1,96*	2,03*	2,83*	1,07	1,03	0,99	0,98
EGFB1045A11.g	Pr 9 peroxidases	1,99*	1,91*	2,85*	2,01*	1,43	0,93	1,01	0,94
EGBK1051A06.g	Proteína quinase	1,43	0,97	2,41*	1,94*	1,95*	2,02*	0,83	0,94
EGRT3123D01.g	Putative phospholipid hydroperoxidase glutathione	1,04	1,00	0,97	1,53*	0,76	0,98	0,72	1,03
EGSL4258C07.g	PR 7 oryzanin	1,58*	1,68*	1,28	1,46	1,53*	1,45	1,48	1,2
EGCL1327C07.g	Enzima de desintoxicação p451	1,36	1,36	1,36	1,27	1,76*	0,97	1,30	1,61*
<u>REPRIMIDOS</u>									
EGST2008E06.g	Fitoeno sintase	0,53*	0,88	0,99	0,97	1,05	0,79	1,01	1,02
EGFB1021A07.g	Ptgs	0,94	0,85	0,94	0,54*	0,92	0,89	1,07	0,94
EGST7267C07.g	Ptgs	1,01	0,85	0,72	0,52*	1,02	0,97	0,90	0,88

*Genes diferentemente expressos de acordo o fold change $\geq 1,5$ ou $\leq 0,6$ induzidos ou reprimidos, respectivamente.

Após tratamento com Acibenzolar-S-metil em plantas do clone VR foram identificadas algumas ESTs relacionadas à defesa vegetal implicadas no estresse oxidativo, como a glutaciona-S-transferase (EGST2233B11.g e EGFB1202C07.g) que se mostraram induzidas em todos os tempos, inoculadas ou não com *P. psidii*. Entretanto, a EST relacionada com a catalase (EGLV1201F10.C) se mostrou induzida apenas nas plantas do clone VR 24 horas após inoculação com o patógeno (Tabela 3). Nas plantas do clone C0 tratadas com Acibenzolar-S-metil as ESTs relacionadas à glutaciona-S-transferase (EGFB1202C07.g) e à glutaciona peroxidase (EGST6257E07.g) se mostraram induzidas independentemente da presença do patógeno (Tabela 4). Com relação às ESTs envolvidas com morte celular programada (EGST2080D02.g) apenas foram encontradas em plantas do clone VR tratadas com Acibenzolar-S-metil após serem inoculadas (Tabela 3). Entretanto, nas plantas do clone C0 essa EST não foi induzida ou reprimida (Tabela 4). Foi possível identificar entre as ESTs, uma que fora envolvida na percepção e transdução de sinal relacionada com a proteína quinase (EGBK1051A06.g) induzida nas plantas dos clones VR e C0 independente da inoculação.

Com relação às proteínas relacionadas com a patogenicidade foram encontradas algumas ESTs se diferenciando nas plantas do clone VR tratadas com Acibenzolar-S-metil ou somente após serem inoculadas com o patógeno (Tabela 3). No clone C0 essas ESTs apenas se mostraram com comportamento diferenciado em função do efeito do Acibenzolar-S-metil e não quando foram inoculadas (Tabela 4). Dentre elas, a EST envolvida com a PR II β -1,3-glucanase (EGST2201A05.g) foi induzida 24, 48 horas após inoculação nas plantas do clone VR quando desafiadas pelo patógeno, entretanto, as plantas do clone C0 foi induzida somente devido o efeito do indutor. A PR III Quitinase (EGLV2266H01.g) foi induzida em ambos os clones quando tratados com o Acibenzolar-S-metil independentemente da ação do fungo. Uma

EST relacionada à peroxidase (EGST6257E07.g) foi induzida nas plantas do clone VR e C0 tratadas com Acibenzolar-S-metil inoculadas ou não com o patógeno (Tabela 3 e 4). Em relação à peroxidação de lipídios, a lipoxigenase (EGLV1202D12.g) se mostrou induzida 24, 48, horas após inoculação com *P. psidii* apenas nas plantas do clone VR (Tabela 1).

ESTs ligadas à síntese de metabólitos secundários antimicrobiano foram identificadas em ambos os clones (C0 e VR). A enzima flavone-3-hydroxilase (EGRT3300C12.g) envolvida no metabolismo de flavonóides foi induzida em plantas tratadas inoculadas ou não. ESTs relacionadas às enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL) (EGSL5065E07.g) também foi induzida nas plantas de ambos os clones quando tratadas com Acibenzolar-S-metil mesmo quando não foram inoculadas .

Além das ESTs envolvidas com a resistência de plantas contra fitopatógenos foi verificado outras relacionadas com genes envolvidos no processo de manutenção celular e desenvolvimento vegetal em função da aplicação de Acibenzolar-S-metil, como duas ESTs relacionadas ao crescimento (EGRT3345C04.g e EGSL1048H11.g) e outra relacionada a Ferredoxina (fotossistema I) (EGLV2299C03.g) que se mostraram induzidas em ambos os clones na presença ou ausência do patógeno (Tabela 3 e 4).

DISCUSSÃO

A partir das ESTs selecionadas para execução desse trabalho foi possível observar importantes alterações relacionadas ao sistema de defesa do eucalipto quando inoculados com *P. psidii* ou quando tratados com indutor de resistência Acibenzolar-S-metil. Foram observadas várias ESTs sendo induzidas ou reprimidas, relacionadas ao fortalecimento da

parede celular, polarização celular, acúmulo de proteínas-RP, enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, enzimas envolvidas na peroxidação de lipídios, acúmulo de compostos fenólicos entre outras.

Referente à polarização celular e fortalecimento da parede celular, dentre as ESTs estudadas, foi possível identificar a tubulina sendo induzida somente nas plantas do clone VR após inoculação com o patógeno. Segundo Gross et al. (1993) a polarização celular, prévia à resposta hipersensível, é uma resposta que envolve uma série de mudanças morfológicas e uma rápida reprogramação metabólica da planta frente a fungos biotróficos na procura de uma resposta rápida e localizada a construção de uma barreira neste sítio reforçando a parede celular.

Após o reconhecimento, uma cascata de sinais é acionada, o que leva à ativação dos mecanismos de defesa das plantas. Um dos primeiros eventos na interação planta-patógeno é a explosão oxidativa, que se constitui na produção de espécies reativas de oxigênio, que pode resultar em reação de hipersensibilidade. A explosão oxidativa produz diversos compostos denominados espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), outros peróxidos, o ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilas livres (OH^-) (Resende, 2003). No presente trabalho, em relação a enzimas reguladoras que podem desintoxicar a célula de espécies ativas em oxigênio foram encontradas, nas plantas do clone VR inoculadas, ESTs como superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase. O indutor Acibenzolar-S-metil teve influência direta sob a indução da EST relacionada a glutathione-S-transferase em ambos os clones (C0 e VR) e sob a EST relacionada a glutathione peroxidase somente no clone C0 independente da ação do patógeno.

Ainda em relação à reação de hipersensibilidade duas ESTs envolvidas na morte celular programada se mostraram induzidas somente em plantas do clone VR tratadas ou não com o indutor de resistência, mas somente após inoculação com o patógeno. Segundo Guzzo (2004) a morte localizada de algumas células vegetais no sítio de penetração de patógenos pode se constituir em um processo eficaz para a contenção de patógenos biotróficos, que necessitam de células vivas para obtenção de nutrientes durante seu desenvolvimento. O colapso da célula vegetal acarreta a liberação de compostos pré-formados, estocados no vacúolo, tóxicos aos microrganismos, que se acumulam nos sítios de infecção impossibilitando o estabelecimento desses patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Foi possível identificar uma ESTs envolvida na percepção e transdução de sinal denominada de proteína quinase sendo induzida nas plantas dos clones VR e C0 apenas quando foram tratados Acibenzolar-S-metil independente da inoculação, evidenciando o efeito do indutor na indução dessa EST. Segundo Guzzo (2004), a expressão da resistência induzida em plantas implica na ativação de mecanismos iniciais de percepção e transdução de sinais, que vão sinalizar a célula vegetal para induzir a expressão de genes e síntese subsequente de compostos de defesa e dentre as proteínas implicadas no mecanismo de percepção e transdução a quinase tem grande importância.

Com relação às proteínas relacionadas com a patogenicidade foram encontradas algumas ESTs se diferenciando nas plantas do clone VR quando foram inoculadas, quando foram tratadas com Acibenzolar-S-metil ou quando foram tratadas e inoculadas com o patógeno. Nas plantas do clone C0 essas ESTs apenas se mostraram induzidas em função do efeito do Acibenzolar-S-metil e não quando foram inoculadas, evidenciando que a indução foi devido a ação do indutor e não do patógeno.

Dentre elas, a EST envolvida com a PR II β -1,3-glucanase foi induzida nas plantas do clone VR quando foram desafiadas pelo patógeno, entretanto, em plantas do clone C0 a EST não se mostrou induzida quando inoculadas ou quando as plantas foram tratadas com indutor de resistência. As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, composto este, que juntamente com a quitina, são os principais componentes que dão resistência a parede celular dos fungos (Cornelissen & Melchers, 1993). As β -1,3-glucanases liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como elicitores de defesas do hospedeiro (Cutt & Klessig, 1992).

A PR III Quitinase foi induzida no clone VR após inoculação ou quando tratadas com Acibenzolar-S-metil, efeito que o indutor ocasionou também em plantas do clone C0, independente da ação do patógeno. Estudos recentes têm mostrado que a super expressão de genes de quitinases em plantas tem aumentado a resistência dessas plantas a patógenos, uma vez que a enzima catalisa a hidrólise dos polímeros quitina, componente principal das paredes celulares dos fungos, podendo apresentar atividade antimicrobiana (Van Loon et al., 2006).

A EST relacionada com a peroxidase foi induzida nas plantas do clone VR sem tratamento com indutor quando inoculada com o patógeno, no entanto a aplicação de Acibenzolar-S-metil também ocasionou a indução nas plantas de ambos os clones inoculados ou não com o patógeno. A enzima peroxidase está diretamente ligada à lignificação dos tecidos a qual polimeriza lignina a partir da oxidação de hidroxilas de grupos fenólicos (Pascholati & Leite 1995). Os mesmos autores argumentam que a lignificação e seus precursores tóxicos exercem papel importante na relação de resistência em plantas de batata infectadas por *P. infestans*. A atividade da peroxidase, na maioria dos casos, aumenta sob

condições de diferentes situações de estresse, provocada por ferimentos, infecções por fungos, salinidade, déficit hídrico, déficit nutricional, dentre outros, levando também ao acréscimo na produção de lignina e etileno (Schallenberger, 1994).

Em relação à EST envolvida com a lipoxigenase pode ser observado na indução apenas nas plantas do clone VR tratadas ou não tratadas com Acibenzolar-S-metil quando foram inoculadas com o patógeno. Segundo Silva et al. (2001) durante um processo de estresse, ocorrem danos físicos às células e em razão disso uma degradação seqüencial de lipídeos pode ser iniciada pelas lipoxigenases. Essas formam hidroperóxidos de ácidos graxos que são rapidamente metabolizados para formar vários produtos. Dentre esses estão a traumatina envolvida na resposta a ferimentos, na indução da divisão celular e formação de calos (Melan et al., 1993), os aldeídos voláteis e oxiácidos que causam efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos (Vaughn e Gardner, 1993).

Em relação às ESTs ligadas a síntese de metabólitos secundários antimicrobianos, o efeito do Acibenzolar-S-metil foi determinante para induzir em ambos os clones a EST relacionada com a enzima flavone-3-hydroxilase envolvida no metabolismo de flavonóides, sendo induzida em plantas inoculadas e não inoculadas. ESTs relacionadas às enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL) EGSL5065E07.g) também foi induzida nas plantas de ambos os clones quando tratadas com Acibenzolar-S-metil mesmo quando não foram inoculadas. Nas plantas do clone VR sem tratamento com indutor, mas inoculadas com o patógeno também foi verificado indução das ESTs fenilalanina amônia-liase, 4-coumarate-coa-ligase 9-cis-epoxicarotenoide-dioxigenase cuja participação resulta em compostos como fitoalexinas.

Duas ESTs relacionadas ao crescimento e à Ferredoxina (fotossistema I) se mostraram induzidas em ambos os clones na presença ou ausência do patógeno quando tratadas com o indutor de resistência, evidenciando o efeito do Acibenzolar-S-meti na ativação de genes envolvidos no processo de manutenção celular e desenvolvimento vegetal.

Como observado nos resultados, em plantas do clone C0 não foi verificado o efeito do fungo interferindo na ativação de genes, no entanto nas plantas do clone VR podem ser observadas diversas ESTs envolvidas em vários mecanismos de defesa sendo expressas quando as plantas foram desafiadas pelo patógeno. Assumindo a possibilidade de que a expressão gênica esteja correlacionada com a penetração do fungo, sugerindo a participação desses genes no mecanismo de defesa das plantas, deve ser considerado, neste clone, a ação de barreiras estruturais pré-existentes nas plantas antes da entrada do patógeno, que possivelmente diferenciam as reações entre os clones. O nível de sucesso dos patógenos em atravessar a primeira barreira de defesa depende do grau de co-evolução da relação patógeno-hospedeiro (Thordal-Christensen, 2003). A composição química, a quantidade e a forma física das ceras epicuticulares de folhas são governadas por muitos fatores, variando entre espécies (Baker & Hunt, 1981). Dessa forma, a consideração da cutícula como estrutura de resistência deve ser analisada com prudência, visto que tal capacidade depende das características desta e do agente de inter-relação (Silva et al., 2005). Esses fatores podem ter sido determinantes para evitar a penetração do patógeno nos tecidos das plantas do clone C0 (moderadamente resistente), evidenciado pela não diferenciação de expressão gênica quando a planta fora desafiada pelo patógeno. Segundo Salvatierra (2006) estudando expressão gênica entre indivíduos de eucalipto suscetíveis e resistentes a ferrugem, concluiu que genes pertencentes à categoria dos componentes estruturais eram mais expressos nos indivíduos resistentes do que

nos suscetíveis apoiando a idéia de que os componentes da parede celular, membrana plasmática e citoesqueleto participam ativamente na defesa contra patógenos.

Em relação às alterações observadas em função do Acibenzolar-S-metil vale ressaltar que mecanismos de defesa em plantas que aparentemente podem estar inativos ou latentes, são ativados e expressos após elas entrarem em contato com algum agente indutor ou a ele serem expostas (Sticher et al. 1997). Para Kuhn (2007) quando a planta é induzida pela presença de um elicitor, são perceptíveis alterações em seu metabolismo. Porém, quando comparada a uma planta induzida com o mesmo elicitor e posteriormente desafiada com um patógeno, nota-se que as alterações no metabolismo são mais intensas do que na planta apenas desafiada ou apenas induzida, ou seja, a planta está mais capacitada para responder a presença do patógeno.

Nas plantas do clone C0 algumas ESTs se mostraram induzidas ou reprimidas apenas quando receberam o tratamento com Acibenzolar-S-metil e não quando foram desafiadas pelo patógeno, evidenciando que expressão diferencial observada seria apenas resultante da adaptação das células da planta frente a condições adversas que geram estresse, no caso a aplicação do indutor Acibenzolar-S-metil. Entretanto, nas plantas do clone VR além de existirem ESTs que foram diferentemente expressas devido à ação do indutor, algumas ESTs foram diferentemente expressas somente quando as plantas previamente tratadas com indutor foram inoculadas com o patógeno, evidenciando que os mecanismos podem ter sido acionados, acarretando diferença de expressão gênica a partir do desafio com o patógeno em plantas pré-condicionadas pelo efeito do Acibenzolar-S-metil.

As plantas possuem mecanismos tanto pré-formados quanto induzidos para impedir a invasão de patógenos (Van Loon et al., 2006). Barreiras mecânicas existentes,

metabólitos secundários e proteínas antimicrobianas devem ser evitadas ou subjugadas pelos patógenos para que estes consigam invadir com sucesso e colonizar os tecidos vegetais. Uma vez havendo o contato, os patógenos produzem e liberam compostos que induzem outras defesas tais como, o reforço da parede celular, produção de fitoalexinas e síntese de proteínas de defesa entre vários outros (Van Loon et al., 2006). Todas as plantas possuem uma resistência basal, mas são suscetíveis quando o patógeno consegue vencer esta resistência ou são resistentes quando impedem que o patógeno tenha sucesso no seu ataque. O que determina se uma planta se torna suscetível ou resistente é a rapidez e magnitude com que tais mecanismos de defesa são ativados e expressos e também pela eficácia com que estes mecanismos de defesa funcionam contra patógenos com diferentes modos de ataque (Wan et al., 2002)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela disponibilização das estruturas do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP/Jaboticabal.

À Karina Maia Dabbas e ao Dr. Marcelo Luiz de Laia do LBM do FCAV/UNESP/Jaboticabal pelo apoio e contribuições para realização do trabalho.

À Profa. Dra. Sônia Marli Zingararetti pelo apoio e confecção das membranas de macroarranjo pelo Brazilian Clone Collection Center (BCCC) FCAV/UNESP/Jaboticabal.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas – Anuário estatístico da ABRAF 2008- disponível em <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp> Acesso em 02 de abril de 2008
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto, Viçosa, UFV, 2004. 442p
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W AND LIPMAN DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B., FURTADO, E.L. Efeito da idade e temperatura na germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* coletados de jambeiro (*Syzygium jambos*) e de goiabeira (*Psidium guajava*). *Summa Phytopathologica*, v.29, p.30-3, 2003
- BOL, J.F; LINTHORST, H.J.M.; CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.28, p.113-138, 1990
- BZScan disponível em: <http://tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/bzscan/>
- CHANG S, PURYEAR J, AND CAIRNEY J A simple method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 11: 113-116, 1993
- CORNELISSEN B, MELCHERS L (1993) Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol* 101:709–712
- COX J Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. *J Immunol Methods* 2001, 250:3-13

- CUTT, J. R.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid in plants. A changing perspective. *Pharmaceutical Technology*, 16, p. 25-34, 1992
- FERREIRA, F.A. Doenças bióticas do eucalipto. In:Ferreira, F.A. Patologia Florestal:Principais doenças florestais no Brasil. Viçosa-MG:SIF, p.93-233, 1989.
- FORESTs - Eucalyptus ESTs Genome Sequencing Project Consortium. Disponível em: <<https://forest.esalq.usp.br>>. Acesso em: 24 de Outubro de 2007
- FURTADO, E.L.; DIAS, D.C.; OHTO, C.T.; ROSA, D.D. Identificação de doenças do eucalipto e coleta de materiais para análise patológica. FCA/UNESP. 56 p. 2008.
- GENTLEMAN, R.C., CAREY, V.J., BATES, D.M. ET AL. (2004) Bioconductor:open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.
- GROSS P., JULIUS C., SCHMELZER E. , AND K HAHLBROCK Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected, cultured parsley cells. *EMBO J.* 1993 May; 12(5): 1735–1744
- GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquiridaem cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Piracicaba, 2004. 236p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.
- HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. cap.8, p.177-199.
- HAMMOND-KOSACK KE, JONES JD. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell.* 1996 Oct;8(10):1773–1791.

- Ihaka,R. and Gentleman,R. (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J. Comp. Graph. Stat.*, 5, 299–314.
- KUHN , O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2007
- MELAN MA, DONG X, ENDARA ME, DAVIS KR, AUSUBEL FM, PETERMAN TK. An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* 1993;101:441–450
- MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant Infection and the Establishment of Fungal Biotrophy. *Trends in Plant Science*, Kidlington, v. 7, n. 8, p. 352-356, 2002
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 22, p. 417-453
- RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). *Plant Pathology*, v.51, p.621-628, 2002.
- SALVATIERRA G. R . Identificação de genes diferencialmente expressos em árvores de *Eucalyptus grandis* suscetíveis e resistentes à *Puccinia psidii*.. 154 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, 2006
- SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Embrapa:Circular Técnica. Colombo, Junho, 2001

- SCHALLENBERGER, E.. Fatores que predispõem as plantas cítricas ao ataque de coleobrocas. Botucatu. 110p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 1994
- SILVA, J. C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. Revista da Madeira, Curitiba, n. 92, p. 61-66, out. 2005
- SILVA, M. D.; OLIVEIRA, M. G. A.; LANNA, A. N.; PIRES, C. V.; PIOVESAN, N. D.; JOSE, I. C.; BATISTA, R. B.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaphorte phaseolorum* F. SP. Meridionalis, agente causal do cancro da haste. Brazilian Journal of Plant Physiology, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 316-328, 2001.
- SOBRINHO.A.C. Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto v. 35, p. 235-270, 1997
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25, 4876–882.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. Current Opinion in Plant Biology, London, v. 6, n. 4, p.351-357, 2003
- VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-62. 2006

VAUGHN SF, GARDNER HW. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean. *J Chem Ecol.*;19:2337–2345, 1993

WAN J, DUNNING FM, BENT AF Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional and Integrative Genomics* 2: 259–273, 2002

3 CONCLUSÕES GERAIS

1. Os tratamentos com Acibenzolar-S-metil (ASM), Ecolife e *Sacharomyces cerevisiae* apresentaram melhores resultados no controle da ferrugem do eucalipto.
2. As folhas mais desenvolvidas (4º par) quando tratadas com Acibenzolar-S-metil e *S. cerevisiae* apresentaram alterações na atividade de quitinase e peroxidase. No entretanto quando inoculadas com *Puccinia psidii* não foi verificado alterações das mesmas.
3. Alterações nos níveis de quitinase e peroxidase após inoculação apenas puderam ser observadas nas folhas em desenvolvimento (1º e 2º pares).
4. O efeito da aplicação de Acibenzolar-S-metil e *S. cerevisiae* foi verificado a partir da atividade das enzimas: quitinase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase, tanto no clone suscetível como no resistente.
5. Várias ESTs relacionadas ao fortalecimento da parede celular, polarização celular, acúmulo de proteínas-RP, enzimas envolvidas na rota dos fenilpropanóides, enzimas envolvidas na peroxidação de lipídios, acúmulo de compostos fenólicos entre outras se mostraram diferentemente expressas após inoculação com o patógeno e/ou tratamento com Acibenzolar-S-metil.

6. Em plantas do clone resistente a ferrugem as ESTs apenas se expressaram quando receberam o tratamento com Acibenzolar-S-metil e não quando foram inoculadas.
7. Em plantas do clone suscetível diversas ESTs envolvidas em vários mecanismos de defesa se expressaram quando as plantas foram desafiadas pelo patógeno, quando apenas foram tratadas com o indutor de resistência ou em plantas previamente tratadas com indutor seguida de inoculação com o patógeno.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas – Anuário estatístico da ABRAF 2008- disponível em <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp> Acesso em 02 de abril de 2008
- AGRIOS, G.N. Plant pathology 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.
- AIST, J.R. Papillae and related wound plugs of plant cells. Annual Review of Phytopathology, Colorado, v.14, p. 145-163, 1976.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto, Viçosa, UFV, 2004. 442p
- ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; BARBOSA, M.M.A. Ferrugem e as opções de controle. Correio Agrícola, v. 1, p. 18-20, 1989
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; ROSA, O.P ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil..P; Fitopatologia brasileira, v.26, n.2, p.221, 2001
- AMBIENTE BRASIL.Disponívelem: [ttp://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./florestal/index.html&conteudo=./florestal/eucalipto.html](http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./florestal/index.html&conteudo=./florestal/eucalipto.html) . Acesso em 08 de abril. 2008
- ANDRADE, E.N. O Eucalipto. Jundiaí: Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667 p
- ANFOKA GH, 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acidS-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Volledung) to cucumber mosaic virus. *Crop Protection* 19, 401–5.
- APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B. *Puccinia psidii* – Efeito da temperatura na

- produção de basidiosporos. In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, Paraná, de 01 a 06 de Agosto de 1999. *Fitopatologia Brasileira.*, v. 24 (Supl.), p.263, 1999
- APARECIDO, C.C., FIGUEIREDO, M.B., FURTADO, E.L. Efeito da idade e temperatura na germinação de uredíniosporos de *Puccinia psidii* coletados de jambeiro (*Syzygium jambos*) e de goiabeira (*Psidium guajava*). *Summa Phytopathologica*, v.29, p.30-3, 2003
- ARAÚJO, E. S. N. N.; GIMENES, M. A.; LOPES, C. R. Phylogenetic relationships among genera *Eucalyptus* and *Corymbia* species based on rDNA internal transcribed spacers sequences. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n 62, p. 75-85, 2002
- ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A (Ed.). *Biotechnology Florestal*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, cap. 5, p. 93-121.
- BARSALOBRES, F.C. Análise da expressão gênica induzida por *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar via macraorranjo de colônias bacterianas. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração: Genética e melhoramento de plantas). Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho- UNESP- Jaboticabal, 246 p. 2004
- BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology* , v. 57, p.101-110, 2000
- BEDENDO, I. P. Ferrugens. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. E AMORIM, L. *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*. 3º ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1., p. 872-880
- BELTRAME, A.B. Efeito de cianobactérias e algas eucarióticas na resistência de plantas de fumo contra o Tobacco mosaic virus (TMV) Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 87p., 2005
- BERTOLUCCI, F.; REZENDE, G.; PENCHEL, R. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. *Silvicultura*, v.51, p.12-16, 1995
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F., ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

- BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, p. 99-109, 1999
- BRACELPA- BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL, ASSOCIAÇÃO. O setor brasileiro de celulose e papel: perfil do setor. São Paulo, 2004. 6p
- BRAZETT, M.D. Industrial Wood. Shell/World Wide Fund for Nature Tree Plantation Review. London: Shell International Petroleum Company and World Wide Fund for Nature Tree Plantation, 1993. 68 p.
- BROOKER, M.I.H.; KLEING, D.A. A field guide to *Eucalyptus*. South Eastern Austrália.Vil.I, Melbourne: Inkata Press, 1990. 299p
- BUZI, A.; CHILOSI, G.; DE SILLO, D.; MAGRO, P. Induction of resistance in melon to *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. *Journal of Phytopathology*, Berlin,v.152, n.1, p.34-42, 2004
- CARDOSO FILHO, J.A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) dos indutores de resistência ácido salicílico, Acilbenzolar-s-metil e *S. cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Telemorfo: *Guignardia citricarpa*) Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 125p., Piracicaba, 2003
- CARVALHO, A.O., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A. CARMO, M.G.F. do. Progresso da ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto no sudoeste da Bahia, período de janeiro de 1987 a novembro de 1989, *Fitopatologia Brasileira*, v.16, p.43, 1991.
- CARVALHO, A.O., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., CARMO, M.G.F. Avaliação do progresso da ferrugem (*Puccinia psidii*) em brotações de *Eucalyptus cloeziana* no sudeste da Bahia, de 1987 a 1981. *Revista Árvore*, v.3, n.18, p.265-74, 1994
- CASTRO, H.A. , KRUGNER, T.L., IDERIHA, C.H.F., CAPELLO, M.S.C., MARCHI, A.B. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium guajava*) e jambeiro (*Syzigium jambos*) com *Puccinia psidii* WINTER. *Fitopatologia brasileira*, v.8, p.491-7, 1983.
- CASTRO, H.A. Padronização da metodologia de inoculação e avaliação da resistência de *Eucalyptus* spp à ferrugem causada por *Puccinia psidii* WINTER. Piracicaba, 1983. 116p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo.

- CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; COSTA, J.C.; SOUZA, R.M. Acibenzolar-S-metil e Ecolife na indução de resistência e respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira*, v.31, p.372-380, 2006.
- CAVALCANTI, L. S. Indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb em plântulas de cacauero (*Theobroma cacao* L.) cv. Teobahia, por benzotiadiazole (ASM). Lavras, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Lavras
- CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO R.M.; PASCHOLATI, S.F.; DE RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R. da S. (Ed.). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ,2005 cap. 4, p. 81-123.
- CIA, P. Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*). Piracicaba, 2005. 187p. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo
- COELHO, L., ALFENAS, A.C., FERREIRA, F.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* – Ferrugem do eucalipto. *Summa Phytopathologica*, v.27, p.295-300, 2001
- COLE, D.L. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal disease of tobacco. *Crop Protection* 18:267-273. 1999
- CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant science*, Kidlington, v. 7, p. 210-216, 2002
- COOLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 61, p. 273-282, 2002.
- COSTA, M.J.N., ZAMBOLIM, L. & RODRIGUES, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32:150-155. 2007.
- COUTINHO, T.A., WINGFIELD, M.J., ALFENAS, A .C. & CROUS, P.W. *Eucalyptus* Rust: A Disease with the Potential for Serious International Implications. *Plant Disease*, v. 82, n.7, p.819–825, July 1998

- DALISAY, R.F.; KUĆ, J.A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 47, p. 315-327, 1995
- DANGL, J. Innate Immunity - Plants Just Say No to Pathogens. *Nature*, London, v.394, n.6693, p.525-+, 1998.
- DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant Pathogens and Integrated Defence Responses to Infection. *Nature*, London, v.411, n.6839, p.826-833, 2001
- DE CARVALHO, A.D.O.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; DO CARMO, M.G.F. Resistance of *Eucalyptus* Species, Progenies and Provenances to *Puccinia psidii* Winter. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.139-147, 1998
- DIANESE, J.C.; MORAES, T.S.D.; SILVA, A.R. Response of *Eucalyptus* Species to Field Infection by *Puccinia- Psidii*. *Plant Disease*, St Paul, v.68, n.4, p.314-316, 1984.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C., VAN WYK, G. *Eucalyptus* domestication and breeding. New York: Oxford University Press, 1994. p.288
- FAO. Global Forest resources assessment 2000 – main report. FAO Forestry paper. Disponível em < <http://www.fao.org/forestry/fo/fra/main/index.jsp> > Acesso em 04 abril 2008.
- FERREIRA, F.A . Ferrugem do eucalipto. *Revista Árvore*, v.7, n.2, p.91-109, 1983
- FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. In: *Patologia Florestal – principais doenças florestais no Brasil*, Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, p.129-151, 1989. 570p
- FERREIRA, F.A., SILVA, A.R. Comportamento de procedência de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). *Fitopatologia Brasileira*, v.7, p.23-8, 1982
- FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. dos. Melhoramento genético florestal do *Eucalyptus* no Brasil . breve histórico e perspectivas. In: *IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF Eucalyptus*, 1997, Salvador. Anais EMBRAPA/CNPF, 1997. p. 14-34.
- FIGUEIREDO, M.B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. *Biológico*, São Paulo, v.63, n.1, p.29-32, 2001
- FIGUEIREDO, M.B., CARVALHO JUNIOR, A.A. Efeito da lavagem dos soros na

- germinação dos soros telióides de *Puccinia pampeana*. *Summa Phytopathologica.*, v.20, p.101-4, 1994.
- FIGUEIREDO, M.B., CARVALHO JUNIOR, A.A. Presença de um auto-inibidor nos teliosporos telióides de *Puccinia pampeana* e o seu papel na sobrevivência da espécie. *Summa Phytopathologica.*, v.21, p.200-5, 1995
- FURTADO, E.L., CASTRO, H.A., POZZA, E.A. Variabilidade fisiológica de *Puccinia psidii* WINTER em *Eucalyptus grandis* e no híbrido urograndis. *Summa Phytopathologica*, v.31, p.227, 2005
- GONZÁLEZ, E.R. Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *E.grandis X E.urophylla* via *Agrobacterium*. 2002. 93p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002
- GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, H. D. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. *Canadian Journal of Forest Research*, v.24, n.5, p.1074-1078, 1994
- GUZZO, S.D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. Piracicaba, 2004. 236p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.
- GUZZO, S.D. Proteínas relacionadas à patogênese. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v.11, p.283-332, 2003.
- GUZZO, S.D.; CASTRO, R.M. DE; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F. Ação protetora do acibenzolar-S-methyl em plantas de cafeeiro contra ferrugem. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.68, n.1, p.89-94, 2001.
- HAMMERSCHMIDT, H.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease control*. Boca Raton: CRC – Lewis Publishers, 1997. cap.8, p.177-199.
- HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. Systematics studies in the *Eucalyptus*: a study of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). *Telopea*, Kingston, v. 6, p. 185-504, 1995
- HOLT III, B.F.; HUBERT, D.A.; DANGL, J.L. Resistance Gene Signaling in Plants - Complex Similarities to Animal Innate Immunity. *Current Opinion in Immunology*, London, v. 15, n. 1, p. 20-25, 2003

- INBAR, M.; DOOSTDAR, H.; SONODA, R.M.; LEIBEE, G.L.; MAYER, R.T. Elicitors of plant defensive systems reduce insect densities and disease incidence. *Journal of Chemical Ecology*, New York, v.24, n.1, p.135-149, 1998
- IUSEUM, A.N.; CORREA de LIMA, J.P.; MERCADO, R.S. Brazil: The Forest sector's participation in international trade. In: NAGY, A. (Ed.). *International Trade in Forest Products*. Bicester: A.B. Academic Publishers, 1988, p. 37-46
- JACOBS, A. K.; DRY, I. B.; ROBINSON, S. P. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethefon. *Plant Pathology*, v. 48, p. 325-336, 1999
- KAISERSLAUTERN TECHNISCHE UNIVERSITÄT. Disponível em: <<http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Hahn/Research/rustfungi.html>>. Acesso em: 07 abril. 2008
- KNOESTER, M.; PIETERSE, C. M. J.; BOL, J. F.; VAN LOON, L. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 12, p. 720-727, 1999
- KRUGER; BACCHI, L. M. A. In: BERGAMIN, A. F.; KITAMI, H.; AMORIM, L. (Ed.) *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap.4
- KRUGNER, T.L. Doenças do eucalipto. In: GALLI, F. (Ed.) *Manual de Fitopatologia*, volume 2, 2a ed., São Paulo, Agronômica Ceres, p.275-96, 1980
- KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. Doenças de eucalipto. In: KIMATI, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M (Ed.). *Manual de Fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. chap. 33, p. 358-375. 2 v.
- KUHN, O.J. Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2007
- KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathway in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, London, n. 5, p. 325-331, 2002
- LABANCA, E.R.G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –Escola Superior de Agricultura “Luiz de

- Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002
- LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed Cell Death, Mitochondria and the Plant Hypersensitive Response. *Nature*, London, v. 411, n. 6839, p. 848-853, 2001.
- LIMA, W.P. Impacto Ambiental do Eucalipto. São Paulo: EDUSP, 1993. 301 p
- LIU, R.; LI, H. F.; SHEN, C. W. F. Detection of pathogenesis related proteins in cotton plants. *Physiological and Molecular Plant pathology*, v. 47, p. 357-363, 1995
- LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.25, p. 244-249, 1999
- MARTINS, E.M.F., CARVALHO Jr., A.A., FIGUEIREDO, M.B. Relação entre *Capsicum frutescens* e os micélios mono e dicarióticos de *Puccinia pampeana*. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.613-7, 1995
- MAZARO S.M. Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 87p. 2007
- MEDEIROS, R.B. de; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 290p
- MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant Infection and the Establishment of Fungal Biotrophy. *Trends in Plant Science*, Kidlington, v. 7, n. 8, p. 352-356, 2002
- MORA, A.L; GARCIA, C.H. A cultura do Eucalipto no Brasil. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000, 112p.
- MORAES, J.P. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v.6, p.261-284, 1998
- MORAES, T. S. de A., GONÇALVES, E.L., REZENDE, G.C. de, MENDES, J., SUITER, F.W. Evolução da ferrugem causada pela *Puccinia psidii* WINTER em *Eucalyptus* spp. Dados preliminares. IPEF, Circular Técnica 144, p.1-12, 1982.
- MORAES, W.B.C. Controle alternativo de fitopatógenos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 27, p. 175-190, 1992
- MORAN, GF; BELL, JC. *Eucalyptus*. In: TANSLEY, D.S.; ORTON, T.J. (Ed.). *Isoenzymes in plant genetics and breeding*. Amsterdam: Elsevier, 1983. Part B,

- MURO-ABAD, J.I.; GOMES, E.A.; CANCIO, O.N.; ARAÚJO, E.F. Genetic analysis of *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* clones selected in commercial crops from the Brazilian Amazon by RAPD markers. *Silvae Genetica*, Frankfurt, v. 50, n. 5-6, p. 177-181, 2001
- O Eucalipto e suas origens. *Revista da Madeira*, Curitiba, n. 59, ano 11, set. 2001.
- ODA, S.; MELLO, E.J.; SILVA, J.F.; SOUZA, I.C.G. Melhoramento florestal. In: BORÉM, A (Ed.). *Biotechnology Florestal*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, cap. 6, p. 123-142
- PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 19, p.363.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 22, p. 417-453.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo: RAPP, 1994, v. 2. p. 1-51
- PICCININ, E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucalyptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Piracicaba, 1995. 107 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo
- PRYOR, L. D.; JOHNSON, L. A. S.; A classification of the *Eucalyptus*. Canberra: Australian National University Press, 1971. 112 p
- RAY, H.; DOUCHES, D. S.; HAMMERSCHMIDT, R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Molecular Plant Pathology*, v.53, p.93-103, 1998
- RAYACHHETRY, M.B.; VAN, T.K.; CENTER, T.D.; ELLIOTT, M.L. Host Range of *Puccinia Psidii*, a Potential Biological Control Agent of *Melaleuca Quinquenervia* in Florida. *Biological Control*, Orlando, v. 22, n. 1, p. 38-45, 2001

- ROXO, C..A. Proposta de agenda do setor brasileiro de florestas plantadas. Palestra no Seminário "A Questão Florestal e o Desenvolvimento", Brasília, 8 de julho de 2003.
- RUGGERI, M. Contributo alla cariologia del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). *Caryologia*, v.14, p.111-120, 1961
- RUIZ, R.A.R., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., BARBOSA, M.M. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. *Fitopatologia brasileira*, v.14, p.73-81, 1989
- SALVATIERRA G. R . Identificação de genes diferencialmente expressos em árvores de *Eucalyptus grandis* susceptíveis e resistentes à *Puccinia psidii*. 154 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, 2006
- SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Embrapa:Circular Técnica. Colombo, Junho, 2001
- SANTOS, P.E.T.; GARCIA, C.H.; MORI, E.S.; MORAES, M.L.T. Potencial para programas de melhoramento, estimativas de parâmetros genéticos e interação progênes x locais em populações de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. IPEF, Piracicaba, n.43/44, p.1119, 1990
- SBS-SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Estatísticas: área plantada com Pinus e eucaliptos no Brasil: 2000. São Paulo: 2001. Disponível em <http://www.sbs.org.br/estatisticas.htm>. Acesso em: 02 abril. 2008.
- SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends in Plant Science*, Kidlington, v. 7, n. 9, p. 411-415, 2002
- SHULAEV, V.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, v. 385, n.6618, p. 718- 721, 1997
- SILVA, J. C. Cresce presença do eucalipto no Brasil. *Revista da Madeira*, Curitiba, n. 92, p. 61-66, out. 2005
- SILVA, S. R.; PASCHOLATI, S. F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. *Journal of Plant Disease and Protection*, v. 99, p. 159-67, 1992.
- SILVEIRA, R. L.V.A.; HIGASHI, E.N.: Aspectos nutricionais envolvidos na ocorrência de doenças com ênfase para a ferrugem (*Puccinia psidii*) do eucalipto CIRCULAR TÉCNICA IPEF n. 200, p. 01-13, dezembro de 2003

- SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *The New Phytologist*, London, v. 132, p. 1-45, 1996.
- SOBRINHO.A.C. Patossistema Caupi x *Macrophomina phaseolina*: método de detecção em sementes, esporulação e controle do patógeno Tese (Doutorado Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 139p., Piracicaba, 2004
- SOUZA, R. R. S. Caracterização anatômica quantitativa e composição de óleos essenciais em três estágios foliares de clones de eucalipto e sua relação com a ferrugem Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Planta) Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho- UNESP- Botucatu, 104 p. 2008
- STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F.; LABATE, C.A. Efeito de *Phaeoisariopsis griseola* na atividade de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase, clorofilase, β -1,3-glucanase e quitinase em cultivares de *Phaseolus vulgaris*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, p. 59-66, 2000.
- STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E. S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 2, p. 16-21, 1999.
- STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.35, p.235-270, 1997
- STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. B. (Ed.). *Plant Biochemistry*. London: Academic Press, 1997. cap. 10, p. 387-416.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Tradução de E.R. SANTARÉM; J.E.de A. MARUATH; L.V.ASTATITA; L.R. DILLENBURG; L.M.G. ROSA; P.L.de OLIVEIRA,. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p
- TARGON, Maria Luisa Penteado Natividade ; TAKITA, Marco Aurélio ; AMARAL, Alexandre Morais Do ; SOUZA, Alessandra Alves de ; LOCALI-FABRIS, Eliane Cristina ; DORTA, Sílvia O ; SOUZA, Juliana Mendonça ; BORGES, Kleber Martins ; RODRIGUES, Carolina Munari ; A.R. Luchetta ; ASTUA, Juliana Freitas ; MACHADO, M. A. . *CitEST libraries.. Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 1019-1023, 2007

- THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, London, v. 6, n. 4, p.351-357, 2003
- TOMMERUP, I.C.; ALFENAS, A.C. e OLD, K.M. Guava rust in Brazil-a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. *New Zealand Journal of Forestry Science*, v.33, n.3, p.420-428. 2003
- TON, J.; VAN PELT, J.A.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Differential effectiveness of salicylate- dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular and Plant Microbe Interaction*, Sant Paul, v.15, p. 27-34, 2002
- TUZUN, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*, v.107, n.1, p.39-50, 2001
- VAN LOON, L.C. The significance of changes in peroxidase in diseased plants. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T.H. (Ed.). *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva: Imprimerie Nationale, 1986. p.405-418
- VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, v.103, n.9, p.753-765, 1997.
- VAN LOON, L.C.; VAN STRIEM, E.A. The families of pathogenesis-related protein, and their activities and comparative analysis of PR-1 type protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, London, v. 55, p. 85-97, 1999
- WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p. 428-435, 1999.
- WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. *Scientia Agrícola*, v. 55, p.138-143, 1998.
- WULFF, N.A. Caracterização enzimática das celulasas xf-810,xf-818 e xf-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína xf-818, expressas em *Escherichia coli* 2002. 195p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002
- YOSHIKAWA, M.; TSUDA, M.; TAKEUCHI, Y. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-glucanase, from soybean. *Naturwissenschaften*, Berlin, v. 80, p. 417-420, 1993.