

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
VEGETAL

Mirella Pupo Santos

**Indução de Sistema de Defesa do Mamoeiro como
Resposta à Elicitores Químico (óxido nítrico) e
Biológico (*Saccharomyces cerevisiae*)**

VITÓRIA

2005

Mirella Pupo Santos

**Indução de Sistema de Defesa do Mamoeiro como
Resposta à Elicitores Químico (óxido nítrico) e
Biológico (*Saccharomyces cerevisiae*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Espírito
Santo, como parte das exigências do
Programa de Pós - Graduação em
Biologia Vegetal, sob orientação da
Prof.^a Dr.^a Patrícia Machado Bueno
Fernandes para obtenção do título de
“Magister Scientiae”

VITÓRIA

2005

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

S237i Santos, Mirella Pupo, 1979-
Indução de sistema de defesa do mamoeiro como resposta à elicitores
químico (óxido nítrico) e biológico (*Saccharomyces cerevisiae* / Mirella
Pupo Santos. – 2005.
74 f. : il.

Orientadora: Patricia Machado Bueno Frenandes

Co-Orientadora: José Aires Ventura.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Mamão. 2. Resposta de defesa. 3. Óxido Nítrico. I. Fernandes,
Patricia Machado Bueno. II. Ventura, José Aires. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

*À DEUS,
Pela vida,*

*Aos meus pais Paulo e Virgínia,
Pelo apoio, incentivo, amizade e amor*

*Ao meu irmão Filipe,
Pelo incentivo, carinho e amizade*

*A minha avó Laura,
pelo carinho e amor*

*Ao meu amor Marcos,
Pelo amor, carinho, incentivo e amizade*

*Aos meus familiares,
À todos que direta ou indiretamente
Contribuíram para a realização deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos colegas, professores e funcionários do departamento de Ciência Fisiológicas, do programa de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo e do INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural) que contribuíram para realização deste trabalho, e em especial:

À prof.^a Dr. Patrícia M. B. Fernandes pela oportunidade fornecida, incentivo e apoio.
Ao Dr. José Aires Ventura pelo apoio, incentivo, paciência e ensinamentos tão proveitosos.

Ao professor Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos pelo apoio, incentivo, paciência e pelo aceite para participação da banca de dissertação.

Ao Dr. José Mauro de Sousa Balbino pela paciência e pelo aceite na participação da banca de dissertação.

Ao prof. Dr. Alberto Fernandes pelo apoio e incentivo.

A prof.^a Maria do Carmo Batitucci Pimentel pelo aceite do convite para participação da banca como suplente.

Ao Dr. Davi dos Santos Martins, Dr. Hécio Costa, prof. Dr. Redins e prof.^a Dr. Eleonora Kurtenbach pelo apoio.

Ao professor Dr. Marco Antônio Aguilar pela colaboração e sugestões.

A minha querida amiga Eliomara S.S. Alves pelo apoio, ajuda, incentivo e amizade.

À minha querida amiga Lucyane Santos pelo apoio, incentivo e amizade.

À minha querida amiga Fabíola Martins pelo apoio e amizade.

À minha tia Cassinha e tio Miguel pela amizade, apoio e ajuda.

Aos colegas Fernando, Tatiane, Silas, Umberto e Olavo pelas sugestões, colaboração e amizade.

A todos os colegas e professores do mestrado

A Universidade Federal do Espírito Santo e seus funcionários

A CAPES pela cessão da bolsa de estudos

RESUMO

A levedura, *S. cerevisiae* e o óxido nítrico (NO) têm sido estudados na indução de respostas de defesa não específicas em plantas. Mudanças de mamoeiro foram tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP) e extrato de *S. cerevisiae*. O extrato de levedura induziu na cv Golden um aumento na concentração de fenóis livres (39%) e ligados (35%) 72 hs após o tratamento. Na cv. Sunrise Solo os fenóis ligados aumentaram 30% após 120 hs. As cvs. Golden e Sunrise Solo apresentaram aumento de 63% e 52% na concentração de fenóis livres 72 hs, após o tratamento com SNP. A atividade de peroxidase aumentou em 336% e 225% em "Golden" e "Sunrise Solo" 168 hs após tratamento com levedura. A atividade de peroxidase nas cvs. Golden e Sunrise Solo apresentaram aumento de 219 % e 203%, 168 hs após o tratamento com SNP. As mudas de "Golden" e "Sunrise Solo" apresentaram aumento de 46 % e 24%, nos valores de carboidratos solúveis totais após 24 hs do tratamento com extrato de levedura, e de 28% e 32% após o tratamento com SNP. As concentrações de sacarose, em 24 hs, de "Golden " e "Sunrise Solo" foram aumentadas em 65% e 72% após tratamento com levedura e de 47% e 34% após tratamento com SNP. Os tratamentos com extrato de levedura e SNP causaram aumento da expressão do gene responsável pela produção da peroxidase ligada a produção de lignina 8 hs. O gene *npr1* e o gene *sod-Mn* não tiveram sua expressão alterada.

ABSTRACT

The yeast extract *S. cerevisiae* and nitric oxide has been studied in the induction of not specific answers in the defense in plants. Papaya plants were treated if SNP and yeast extract. The yeast extract in Golden culture induced increase of the free phenol concentration (39 %) and connected (35 %) after 72 hrs the treatment. In Sunrise Solo, the treatment induce the accumulation of connected phenols, the increase (30 %) occurred mainly 120 hrs after. The SNP was capable to increase in 63 % after 72 hrs the concentration of free phenols in Golden culture. In the Sunrise culture has increase of free phenols 30% after 72 hs. The treatment with the leavening induced the increase of the enzymatic activity in the Golden culture it was of 84% after 72 hrs, reaching at 336 % in 168 hrs. However in the Sunrise culture the increase in the activity of peroxide was of 87% and 225% after 72hrs and 168hrs respectively. The activity of peroxides in the Golden culture presented an increase of 129 % after 72 hrs and 219 % after 168 hrs after the treatment with SNP. In the Sunrise Solo culture it had an increase of 131% and 203 % after 72 hrs and 168 hrs respectively. In the Golden cultivar's has increase in the concentration of total sugar (46%) after 24 hs. In the cultivar Sunrise Solo after 24 hs has increase (24%) after yeast treatment. It had an increase in the concentration of sucrose in both culture when treated with leavening extract, been that this increase was bigger after 24 hrs and 48 hs of treatment (47% and 34%). The treatment with SNP induced an increase in the levels of sucrose in both cultures been that this increase was bigger (77%) after 24 hrs of treatment. The treatments with extract of leavening and SNP had caused an increase of the expression of the responsible gene for the production of peroxides on the production of lignin after 4 and 8hrs. The gene npr1 and gene sod-Mn did not have its expression modified with both treatments.

LISTA DE FIGURAS

Figura1- Representação do ciclo da ascorbato /glutathiona	34
Figura 2- Modelo esquemático das vias de sinalização e respostas de defesa presentes em plantas (adaptado se RESENDE et al., 2003; LAMB; DIXON,L1997).....	37
Figura 3- Teor de fenóis expressos em µg de ácido clorogênico em mudas das cultivares Golden (A) e Sunrise Solo (B) tratadas com extrato de levedura em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 horas). —□— Fenóis livres em mudas tratadas com água destilada; —■— Fenóis livres em mudas tratadas com extrato de levedura; —△— Fenóis ligados em mudas tratadas água destilada; —▲— Fenóis ligados em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras representam o erro padrão.....	51
Figura 4 - Teor de fenóis expressos em µg de ácido clorogênico em mudas das cultivares Golden (A) e Sunrise Solo (B) tratadas com SNP em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 horas). —□— Fenóis livres em mudas tratadas com água destilada; —■— Fenóis livres em mudas tratadas com SNP; —△— Fenóis ligados em mudas tratadas com água destilada; —▲— Fenóis ligados em mudas tratadas com SNP. As barras representam o erro padrão.....	52
Figura 5 - Atividade de peroxidase em plantas das cultivares Golden (A) e Sunrise Solo (B) tratadas com extrato de levedura em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 hs). —△— Atividade de peroxidase em mudas tratadas com água destilada; —▲— Atividade de peroxidase em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras correspondem ao erro padrão.....	58
Figura 6- Atividade da peroxidase em plantas das cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com SNP em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 hs). —△— Atividade de peroxidase em mudas tratadas com água destilada; —▲— Atividade de peroxidase em mudas tratadas com SNP. As barras correspondem ao erro padrão das médias de 9 repetições.....	60
Figura 7- Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Golden tratadas com extrato de levedura; —□— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; —■— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas	

com extrato de levedura. As barras correspondem ao erro padrão.....	62
Figura 8 - Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Sunrise Solo tratadas com extrato de levedura; —□— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; —■— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras correspondem ao erro padrão.....	63
Figura 9- Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Golden tratadas com SNP; —□— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; —■— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com SNP. As barras correspondem ao erro padrão.....	65
Figura 10- Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Sunrise Solo com SNP; —□— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; —■— Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com SNP. As barras correspondem ao erro padrão.....	66
Figura 11 – Expressão gênica em <i>Carica papaya</i> , cultivar Golden. CO- Mudas tratadas com água destilada; SNP- mudas tratadas com SNP; LEV- Mudas tratadas com extrato de levedura. A- gene da proteína actina; B- gene da proteína peroxidase. 1- Expressão gênica 0 hs; 2 Expressão gênica após 4 hs de tratamento; 3- expressão gênica após 8 hs de tratamento.....	69
Figura 12 – Expressão do gene <i>npr1</i> em <i>Carica papaya</i> , cultivar Golden. CO- Mudas tratadas com água destilada; SNP- mudas tratadas com SNP; LEV- Mudas tratadas com extrato de levedura. 1- Expressão gênica 0 hs; 2 Expressão gênica após 4 hs de tratamento; 3- expressão gênica após 8 hs de tratamento.....	70
Figura 13 – Expressão gênica da proteína SOD-MN em <i>Carica papaya</i> , cultivar Golden. CO- Mudas tratadas com água destilada; SNP- mudas tratadas com SNP; LEV- Mudas tratadas com extrato de levedura. 1- Expressão gênica 0 hs; 2 Expressão gênica após 4 hs de tratamento; 3- expressão gênica após 8 hs de tratamento.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos, organismo de origem e suas respectivas seqüências.....	44
Tabela 2- Componentes da reação de RT para obtenção do cDNA.....	46
Tabela 3- Concentrações médias de fenóis livres e ligados nas cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com água (T1), SNP (T2) e extrato de levedura (T3).....	54
Tabela 4- Atividade média da atividade de peroxidase nas cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com água (T1), SNP (T2) e extrato de levedura (T3).....	60
Tabela 5- Concentrações médias de açúcares totais, frutose e sacarose nas cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com água (T1), SNP (T2) e extrato de levedura (T3).....	68

LISTA DE SIGLAS

AS - Ácido salicílico
APX - Ascorbato peroxidase
CAD – Cinamil desidrogenase
CAT - Catalase
CTAB – Hexadeciltrimetil brometo de amônia
DEPC - Dietilpirocarboneto
DTT - Dithiothreitol
EAOs – Espécie ativas de oxigênio
EDTA – Etilenodiamina tetra acetato de sódio
EBC – Extrato bruto
EROs- Espécies reativas de oxigênio
FAL – Fenilalanina amônia liase
INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
LOX – Lipoxigenases
JA – Jjasmonatos
Me Ja – Metil jasmonatos
NPR1 – Proteína relacionada a respostas de defesa em plantas
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
PCR – Reação em cadeia de polimerase
POX – Peroxidase
PR – Pathogenesis related – proteínas relacionadas a patogênese
PVP- Polivinilpirrolidona
RH – Resposta de hipersensibilidade
RSA – Resistência sistêmica adquirida
RSI – Resistência sistêmica induzida
RT – Transcriptase Reversa
SNP – Nitroprussiato de sódio
SOD – Superóxido desmutase
Tris- 2,3-dibromopropila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1	A CULTURA DO MAMÃO: HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA.....	14
1.2	MECANISMO DE DEFESA EM PLANTAS	16
1.3	RECONHECIMENTO PLANTA-PATÓGENO	17
1.4	ELICITORES.....	18
1.5	VIAS DE SINALIZAÇÃO AO ESTRESSE EM PLANTAS.....	21
1.6	RESPOSTA DE DEFESA DA PLANTA.....	23
1.6.1	Compostos Fenólicos	24
1.6.2	Fitoalexinas	25
1.6.3	Proteínas Relacionadas a Patogênese (PRs)	26
1.6.3.1	Peroxidasas.....	27
1.6.3.2	Proteína NPR1.....	28
1.6.4	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	29
1.6.4.1	Superóxido.....	29
1.6.4.2	Peróxido de hidrogênio.....	30
1.6.4.3	Radical Hidroxila.....	30
1.6.4.4	Óxido Nítrico.....	31
1.6.5	Enzimas Antioxidantes	33
1.6.5.1	SOD.....	33
1.6.5.2	Catalases.....	33
1.6.5.3	Ciclo da ascorbato/glutationa.....	34
1.6.6	Acúmulo de Carboidratos	34
1.7	IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE INDUÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA.....	36

2 OBJETIVO 38

3 MATERIAIS DE MÉTODOS

3.1	Material Vegetal.....	39
3.2	Tratamento com Óxido Nítrico.....	39
3.3	Tratamento com extrato de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
3.4	Avaliação das respostas de defesa.....	40
3.4.1	Dosagem do teor de compostos fenólicos.....	40
3.4.2	Dosagem da atividade da peroxidase.....	41
3.4.3	Determinação do conteúdo protéico total.....	41
3.4.4	Determinação da concentração de frutose, sacarose e carboidratos solúveis totais.....	42
3.4.4.1	Preparo do extrato bruto para dosagem de carboidratos.....	42

3.4.4.2	Dosagem de carboidratos solúveis totais.....	42
3.4.4.3	Dosagem de frutose.....	43
3.4.4.4	Dosagem de sacarose.....	43
3.4.5	Análise da expressão gênica.....	44
3.4.5.1	Oligonucleotídeos.....	44
3.4.5.2	Extração de RNA.....	44
3.4.5.3	Tratamento Enzimático.....	46
3.4.5.4	Reação de RT.....	46
3.4.5.5	Reação em cadeia de Polimerase (PCR).....	47
3.4.5.6	Análise do Tm dos Oligonucleotídeos.....	47
4.5.5.7	Eletroforese em gel de Agarose.....	48
3.4.5	Análise estatística.....	48

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1	Teor de Fenóis livres e ligados a parede celular.....	49
4.2	Atividade de peroxidase.....	55
4.3	Concentração de carboidratos.....	62
4.4	Análise da expressão gênica.....	69

5	CONCLUSÕES.....	72
----------	------------------------	-----------

6	REFERÊNCIAS.....	73
----------	-------------------------	-----------

7	APÊNDICES.....	86
----------	-----------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CULTURA DO MAMÃO: HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA

A fruticultura no estado do Espírito Santo é uma atividade de grande importância social e econômica, pois é responsável pela geração de cerca de 50 mil empregos diretos no processo de produção e outros tantos no processo de comercialização. Além disto, o grande aumento do consumo de frutas, tanto no mercado interno, quanto externo, atraiu os investimentos na agroindústria com a implantação do forte parque agro-industrial para processamento de frutas, potencializando o agronegócio da fruticultura em todo o estado. A fruticultura ocupa uma área plantada de 85 mil hectares no Estado do Espírito Santo, com uma produção anual da ordem de 1,2 milhões de toneladas, o que proporciona uma renda superior a R\$ 450 milhões por ano, sendo hoje a segunda atividade da agropecuária estadual, só superada pela cafeicultura (SILVA; GOMES, 2002).

Dentre as fruteiras cultivadas no estado do Espírito Santo destaca-se o mamoeiro. O Espírito Santo é o segundo maior produtor, com aproximadamente 1/3 da produção nacional, cerca de 500 milhões de frutos por ano, e o maior exportador do país, com mais de 80% do volume de mamão exportado. A área de cultivo no estado já ocupa mais de 42 mil hectares sendo a região norte do estado responsável pela maior parte da produção com aproximadamente 95% desta área. Devido às condições favoráveis de solo e clima, aliadas a introdução da cultivar Sunrise Solo, a exploração do mamão tornou-se uma atividade agrícola de alta rentabilidade e importância econômica para o estado do Espírito Santo (ALVES, 2003).

A espécie *Carica papaya* L. é a mais cultivada no mundo, sendo uma planta originária da América Tropical, cuja vida útil economicamente viável encontra-se em torno de 2 a 3 anos (OLIVEIRA et al., 1994).

O Brasil é o maior produtor de mamão do mundo com a produção de 1.440.000 t/ ano, correspondente a 35% da produção mundial. Além de grande

produtor, o Brasil destaca-se como grande exportador, principalmente para os Estados Unidos (NAKAMAE, 2003; ALVES et al., 2003).

Os cultivares de mamoeiro mais explorados no Brasil são classificados em dois grupos, grupo Solo e grupo Formosa. As cultivares que mais se destacam do grupo Solo são:

- Cv. Sunrise Solo: Cultivar procedente do Havaí e introduzido no Brasil há mais de 25 anos. É conhecido no Brasil, como mamão Havaí, possui casca lisa e firme, polpa vermelho-alaranjada de boa qualidade e cavidade interna estrelada. Possui tamanho pequeno (peso variando entre 425 e 625 g) e formato piriforme a ovalado. O início da produção é de nove a dez meses após o plantio, produzindo em média 60 à 45/t/ha/ano (COSTA; PACOVA, 2003).

- Cv. Golden: É proveniente de seleção de plantas, realizada pelo engenheiro Carlos Henrique Rodrigues em campos de produção de Sunrise Solo, na empresa Caliman Agrícola S/A, no Estado do Espírito Santo. Possui casca lisa, cavidade interna estrelada, tamanho uniforme, com peso médio de 450 g e excelente aspecto visual. No estágio verde possui a coloração da casca mais verde que a Sunrise Solo. Tem boa aceitação no mercado internacional apesar de possuir menor conteúdo de sólidos solúveis que os frutos da Sunrise Solo (COSTA; PACOVA, 2003).

1.2 MECANISMOS DE DEFESA EM PLANTAS

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de resposta aos diversos tipos de estresses sejam eles bióticos, como ataque de patógenos, ou abióticos como os estresses ambientais. Os mecanismos de defesa das plantas são acionados ou ativados quando há interação entre uma molécula elicitora, como moléculas de patógenos, e proteínas de membrana das células vegetais (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999).

As respostas de defesa iniciam com a percepção do estresse, seguido do desencadeamento de uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em

vários níveis de respostas fisiológicas e metabólicas podendo tornar a planta resistente ao estresse (BRAY, 1993).

Os principais tipos de resistência são: a resistência local (RH), a resistência sistêmica adquirida (RSA) e a resistência sistêmica induzida (RSI).

A resistência local, conhecida como reação de hipersensibilidade (RH), pode levar a morte local das células situadas onde o elicitor se instala. Os aspectos fisiológicos da RH incluem o aumento rápido de agentes oxidantes, perda de íons potássio e ganho de íons hidrogênio pelas células, espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa (conhecidas como proteínas PR, de "pathogenesis related"). Já a resposta sistêmica adquirida (RSA) protege a planta, junto com a resistência local, contra os ataques de patógenos. Induzida por diversos agentes após uma infecção, a RSA torna a planta resistente por várias semanas e possui como sinalizador o ácido salicílico (AS) (Figura 1; pág. 17) (MARIGIS-PINHEIRO, 1998). Existe, ainda, além da RSA, a resposta sistêmica induzida (RSI) que possui como diferença o sinalizador que neste caso é o jasmonato (JA) ou etileno (Figura 1; pág. 17) (OLIVER; IPCHO, 2004).

Os patógenos podem ser classificados de acordo com a filogenética ou pelo processo de infecção. De acordo com o processo infeccioso, estes são classificados em biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos, sendo que, cada tipo de patógeno ativa uma via diferente na sinalização de respostas de defesa na planta infectada.

Os biotróficos são patógenos que se desenvolvem de células vivas, e que geralmente, podem induzir a resposta de hipersensibilidade levando a célula à morte. A sinalização utilizada pelas plantas para se defender deste tipo de patógeno é a via do AS levando à RSA. Os necrotróficos são organismos que se desenvolvem em células mortas. Estes patógenos são capazes de ativar a via de sinalização tendo o JA e etileno como mensageiros, levando à RSI (OLIVER; IPCHO, 2004). Já os hemibiotróficos são os patógenos que podem ser tanto biotróficos como necrotróficos.

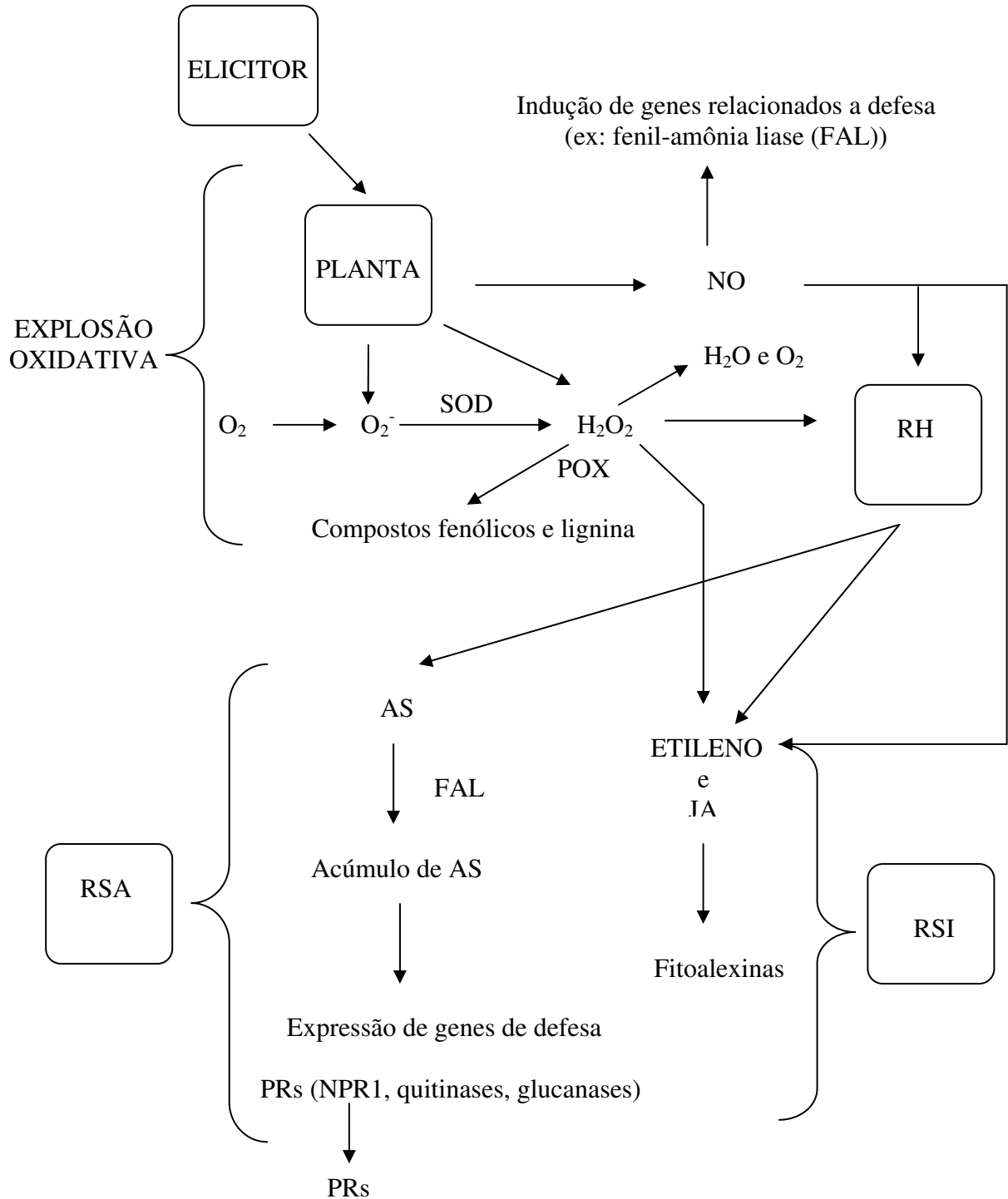


Figura 1- Modelo esquemático das vias de sinalização e respostas de defesa presentes em planta (adaptado de RESENDE et al., 2003 e LAMB; DIXON, 1997).

1.3 RECONHECIMENTO PLANTA-PATÓGENO

Para haver resposta de defesa é necessário que a planta reconheça o patógeno. Este reconhecimento ocorre por meio da ligação do elicitor a um receptor presente na membrana plasmática da célula. O elicitor é definido como uma molécula capaz de induzir qualquer resposta de defesa em um organismo (FAUTH et al., 1996). O receptor, normalmente de natureza protéica, pode estar localizado na membrana e/ou no interior da célula vegetal. Receptores para moléculas de fungos e alguns nematóides estão localizados na membrana plasmática. Já para os vírus e algumas bactérias os receptores estão no interior das células, podendo ocorrer no citoplasma ou mesmo no núcleo (HUTCHESON, 1998).

As interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis, quando o organismo fitopatogênico consegue invadir e colonizar o hospedeiro sem desencadear respostas específicas de defesa, e incompatíveis quando o patógeno não consegue infectar a planta, pois o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência. Resumindo, a interação entre um patógeno e um vegetal é dita compatível quando leva à doença e incompatível quando a planta resiste a interação. Geralmente a presença de um gene de resistência dominante na planta (*R*) e um gene de avirulência dominante no patógeno (*Avr*) condiciona a incompatibilidade em interações gene-gene (RESENDE et al., 2003).

O reconhecimento do patógeno ou de um elicitor é importante para a maioria dos casos de resistência específica e para muitos casos de indução de resistência. Em determinadas relações incompatíveis e na indução de resistência com certos indutores não há a etapa de reconhecimento para se ter o estabelecimento de respostas de defesa (HEATH, 2001 a)

1.4 ELICITORES

O elicitor pode ser uma molécula presente em um organismo ou mesmo moléculas produzidas pela própria planta que têm como função gerar respostas de defesa. Estes podem ser moléculas de fungos, bactérias e vírus (ANDREU et al., 1998).

A maioria dos elicitores constitui-se de proteínas e carboidratos presentes nas células dos fitopatógenos (HAHN, 1996; RICCI, 1997). Diversos carboidratos e proteínas de atividade elicitora foram isolados da parede celular fúngica. Durante a interação fungo-planta ocorre a síntese de elicitores que ficam armazenados em suas paredes celulares (SCHAFFRATH et al., 1995; SCHWEIZER et al., 2000). O uso de um mesmo elicitor é capaz de conferir proteção a diversos tipos de patógenos (GODARD et al., 1999; GORLACH et al., 1996; ISHI, 1999)

Alguns estudos comprovam a indução de respostas de defesa em plantas por elicitores. Plantas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium* tiveram acúmulo de compostos fenólicos (STEIN et al., 1993). Oliveira (1994) observou a indução da formação de lignina e o aumento da atividade da peroxidase em bracinga (*Mimosa scabrella*) por um fungo não patogênico.

As plantas possuem mecanismos que conferem proteção contra uma gama de patógenos potenciais e que consiste em barreiras químicas e estruturais e podem ser induzida por diversos organismos (HEATH, 1995).

A levedura, *Saccharomyces cerevisiae* tem sido estudada na indução de respostas de defesa não específicas em plantas. Em plantas de sorgo houve redução da severidade da doença quando da aplicação de *S. cerevisiae* antes e após o patógeno *C. graminicola*. Em plantas de maracujá houve a redução do número de lesões locais e infecção sistêmica causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflora* quando tratadas com *S. cerevisiae* (PASCHOLATI, 1998).

Existem vários tipos de elicitores, sendo que o seu grau de especificidade depende de sua fonte. Elicitores produzidos por genes *Avr* são os mais específicos, exemplo disto é a proteína AVR 9 produzida por *Cladosporium fulvum* (Sin. *Fulvia fulvum*) capaz de induzir diversas respostas de defesa em variedades de tomate que contém o gene de resistência Cf9. Raças virulentas não produzem elicitores ou os

elicitores produzidos não são reconhecidos devido a ausência do gene de resistência no hospedeiro (VAN DEN ACKERVEKEN; DE WIT, 1995).

Há ainda elicitores menos específicos, como é o caso das elicitinas, que são proteínas extracelulares produzidas por diferentes espécies fitopatogênicas de *Phytophthora* capazes de induzir respostas de defesa em várias plantas (RICCI, 1997). As harpinas também são elicitores protéicos produzidos por bactérias apenas quando há expressão de um gene *hrp* e são capazes de induzir respostas de defesa, como a reação de hipersensibilidade, em plantas não hospedeiras deste patógeno. Devido as propriedades de indução de resistência, vários indutores têm sido utilizados comercialmente, entre eles uma harpina produzida por *Erwinia amylovora* que recebeu o nome de “Messenger” (HUTCHESON, 1998; WEI et al, 1992).

Uma parte dos elicitores protéicos não possui atividade enzimática, e mesmo quando submetidos ao calor não perdem sua propriedade elicitora (DAVIS et al., 1998; WULFF, PASCHOLATI, 1999). Entretanto, há aqueles cuja estrutura terciária e quaternária das proteínas é importante para sua atividade. Foi isolado do feijão um elicitor capaz de inibir a ação de poligalacturonase fúngica. O inibidor se encaixa na enzima dependendo de sua conformação espacial, portanto há necessidade de sua estrutura intacta que este apresente atividade (CERVONE et al., 1989; HUTCHESON, 1998).

Há elicitores que possuem uma parte protéica e uma porção glicosilada sendo que muitos destes não necessitam de toda a sua estrutura para serem ativos. Algumas glicoproteínas necessitam apenas de uma das porções para induzirem respostas de defesa (GUZZO, 1989; SCHWEIZERE et al., 2000, WULFF; PASCHOLATI, 1999). Schaffrath et al (1995) isolaram um elicitor glicoprotéico a partir de micélio de *Pyricularia grisea* e observaram que este necessita apenas da parte glicosilada para apresentar atividade, além disto, quando esta é submetida ao tratamento com tripsina seu poder de elicitação é aumentado. Alguns elicitores que têm sua estrutura alterada pela retirada de ramificações ou outros grupamentos podem manter intacta, aumentar ou diminuir sua atividade elicitora (BASSE et al., 1992; RICCI et al., 1993).

Existem também diversos carboidratos que possuem ação elicitora. Alguns como, glucanas, mananas e oligômeros formados por N-acetilglucosamina já foram

isolados de parede celular fúngica (SCHAFFRATH et al., 1995; SCWEIZER et al., 2000; HAHN; ALBERSHEIM, 1978). A ação de enzimas vegetais como as quitinase e β -1,3 glucanases atuam degradando a parede celular do patógeno e acabam por liberar estes compostos, os quais ativam o sistema de defesa da planta (HAMMERSCHMIDT, 1999).

Há carboidratos, que não possuem ação elicitora, sendo que, alguns podem até possuir ação supressora. Algumas glucanas isoladas do micélio de raças mais virulentas de *Phytophthora infestans* suprimem as respostas de defesa (ANDREU et al., 1998).

Outros compostos diferentes de carboidratos e proteínas também já foram descritas por participar na cascata de sinalização de respostas de defesa, como por exemplo, o ácido salicílico (AS) e os jasmonatos (JA) que são substâncias importantes nas vias de sinalização de respostas de defesa em plantas (BOSTOOK, 1999; HAMNERCHAT, 1999; MAUCH-MANI, 1998) (Figura 1; pág. 17).

O óxido nítrico (ON) é uma espécie reativa importante nas vias de respostas de defesa em plantas. Recentemente o ON foi caracterizado como indutor da expressão de genes relacionados com a biossíntese de fitoalexinas em soja (*Glycine max*), fumo (*Nicotiana tabacum*) e batata (*Solanum tuberosum*) (DELLEDONNE et al., 1998; DURNER et al., 1998; NORITAKE et al., 1996) (Figura 1; pág. 16). Pedroso et al, 2000 observaram a indução de resposta de hipersensibilidade em *Kalanchoe daigremontiana* e *Taxus brevifolia* pelo ON. O aumento nos níveis de atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) conferiu resistência em plantas de tabaco transgênicas ao vírus do mosaico do tabaco (DURNER et al., 1998) e a *Raustonia solanacearum* (HUANG; KNOPP, 1998). Foi observado também que a inibição da produção de óxido nítrico compromete as respostas de defesa de *Arabidopsis* ao ataque de *Pseudomonas syringae*. Em conjunto, estes resultados apontam para um papel sinalizador do ON no processo de defesa em plantas.

1.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO AO ESTRESSE EM PLANTAS

Após o reconhecimento do patógeno, a planta passa a manifestar as respostas de defesa. Para que as respostas de defesa ocorram há necessidade da geração de sinais que criam cascatas, finalizando na ativação de genes relacionados a defesa local ou sistêmica (KUC, 1995).

A sinalização não é ainda bem compreendida, entretanto, resultados de literatura indicam que as etapas envolvidas não seguem uma via única, existindo várias bifurcações na cascata sinalizadora que leva à diversos tipos de respostas.

Um modelo bastante conhecido em células eucariontes é a cascata via proteína G. A sinalização primária leva a alteração do receptor específico, expondo o sítio de ligação para a proteína G. A ligação da proteína G ao receptor aumenta a afinidade da primeira pelo GTP, o que leva a sua ativação e causa a dissociação de suas sub-unidades. Isto traz como consequência a ativação de proteínas, como fosfolipases e adenil ciclase, canais de cálcio, e receptores de quitinases (LEITE et al., 1997; LOW; SCHROEDER, 1997).

Algumas fosfolipases estão envolvidas na ativação de proteínas quinases moduladas por cálcio. A fosforilação de proteínas citoplasmáticas por quinases pode levar ao estímulo de uma oxidase de membrana envolvida na geração do íon superóxido, que por sua vez gera a produção de espécies reativas ou ativas de oxigênio (EROs ou EAOs), fenômeno conhecido como explosão oxidativa (TENHAKEN et al., 1995). A explosão oxidativa é um evento importante no desenvolvimento da reação de hipersensibilidade e no desencadeamento de outras respostas de defesa (CHAMNONGPOL et al., 1998; COSTEL et al., 1999; GREENBERG, 1996; KOGEL; HUCKELHOVEN, 1999).

Kock et al (1998) utilizaram inibidores da fosfolipase C em culturas de células de cenoura elicítadas com uma proteína fúngica e estes inibidores bloquearam a via dos fenilpropanóides sem afetar a reação de hipersensibilidade. Foi verificado também que quando células não elicítadas eram tratadas com ativadores da proteína G houve o estímulo de hipersensibilidade sem que a via dos fenilpropanóides fosse afetada.

Os sinalizadores primários induzem a produção de mensageiros secundários (EAOs, cálcio, quinases de proteínas, AS, JA, entre outros), o que ocasiona a transcrição de genes de defesa (LEITE et al., 1997).

Mensageiros, como AS e JA são importantes para sinalização, sendo que cada um destes atua em uma via sinalizadora diferente (Figura 1; pág. 17) (BOSTOCK, 1999; HAMMERSCHMIDT, 1999; DURRANT; DONG, 2004). Além das vias dependentes de AS e JA existem outras vias de sinalização que ainda não foram elucidadas (MAUCHI-MANI; MÉTRAUX, 1998, VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

A indução de resistência associa RSA, que leva a síntese de proteínas-PR e acúmulo de AS e a RSI, que causa o acúmulo de JA e síntese de defensinas, tioninas e de inibidores de proteinase (HAMMERSCHMIDT, 1999 a; MAUCHI-MANI; METRAX, 1998; STICHER et al., 1997; DURRANT; DONG, 2004) (Figura 1; pág. 16).

Quando ocorre a indução de resistência via AS, uma das primeiras alterações manifestadas é o acúmulo do AS nos tecidos vegetais (COSTER et al., 1999, REPKAR et al., 2000). O fato ocorre devido ao aumento da atividade de enzimas da via dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (FAL), através da qual o AS é sintetizado (METRAUX, 2001; MORAES, 1998; STICHER; METRAUX, 2000). O aumento de AS nos tecidos vegetais pode levar ao aumento da resistência a fungos e vírus. A cascata sinalizadora via AS possui uma bifurcação, uma das vias leva a ativação de genes que expressam proteínas de defesa como a RP1 conferindo resistência a fungos e a outra leva a ativação de uma oxidase mitocondrial capaz de controlar os níveis de EAOs que mediará a resistência a vírus (MURPHY et al., 2001).

Morais (1998) e Sticher et al (1997) demonstraram a importância do AS no estabelecimento da RSA em plantas transgênicas para produção do salicilato hidroxilase (plantas NahG). Esta enzima impede o acúmulo de AS pela transformação deste em catecol. Carmeron (2000) alerta para a possibilidade da incapacidade de plantas NahG em estabelecerem RSA não estar ligada diretamente ao AS mais sim ao funcionamento da via dos fenilpropanóides, provocado pela retirada do AS e pela falta de outros compostos relacionados a defesa produzidos nesta mesma via.

Na via de sinalização dependente de JA não há necessidade de acúmulo de AS, já que plantas NahG podem estabelecer resistência sistêmica induzida (RSI) mediada por JA (Figura 1; pág. 17) (VAN LOON et al., 2001). Trabalhos demonstram

o estabelecimento de RSI com o tratamento de JA ou metil jasmonatos (MeJA) e que isto não depende somente do JA ou MeJA, mas também da resposta da plantas ao etileno. Plantas que possuem a síntese de etileno comprometida podem expressar RSA, mas não RSI (KNOESTER et al., 1999).

1.6 RESPOSTAS DE DEFESA DA PLANTA

As respostas de defesa das plantas são divididas em barreiras estruturais ou mecânicas e em barreiras químicas e podem ser resultado da ativação de genes de defesa ou do aumento da atividade de determinadas enzimas (PASCHOLATE; LEITE, 1995).

A barreira estrutural consiste no aumento da produção e deposição de lignina, via a rota do ácido chiquímico e fenilpropanóides, nas paredes celulares de forma a evitar a penetração do patógeno. Pode ocorrer também a transformação da composição da cutícula tornando mais difícil a sua digestão por microorganismos (HUANG; KUC, 1995).

A cutícula é primeira barreira estrutural encontrada na planta. A cutícula é formada por cutina, substância esta degradada pelas cutinases produzidas por patógeno. A cutina pode tornar-se mais resistente a degradação enzimática caso haja indução de resistência (HUANG; KUC, 1995). A segunda barreira é a parede celular que, como a cutícula, pode ser fortificada pelo tratamento com indutores de resistência. Fauth et al (1996) demonstraram que hipocótilos de pepino tratados com ácido 2,6 dicloroisonicótico (DICA) tiveram a penetração por fungo reduzida em quase 100% graças ao espessamento da parede celular. Foi verificado também que o uso de Milsana (indutor de resistência) provoca alterações qualitativas como formação de papilas, aposições de parede e acúmulo de compostos fenólicos (WURMS et al. 1999). O desenvolvimento de um fungo em ervilha ficou restrito às células da epiderme e suas estruturas sofreram alterações drásticas quando tratadas com glucanas, quitina e laminarina (BENHAMOU; GRAND, 2001; BENHAMOU; AFONTAINE, 1995).

A barreira química ocorre com o aumento da síntese de compostos fenólicos e fitoalexinas e também com o aumento na concentração e/ou atividade das proteínas de defesa (DUBERY; SLATER, 1997; MARGIS-PINHEIRO et al., 1999). Há ainda o aumento na produção de espécies reativas ou ativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) que atuam diretamente sobre o patógeno causando efeito tóxico, além de participarem como sinalizadores de outras respostas de defesa (RESENDE et al., 2003; OROZCO-CÁRDENAS; RYAN, 2002; MODOLO et al., 2002).

1.6.1 Compostos Fenólicos

Compostos fenólicos são compostos químicos formados por um anel benzênico ao qual está ligada uma hidroxila. São produtos do metabolismo secundário das plantas e estão relacionados à defesa (STRACK, 1997). Nem todos têm função conhecida, sendo que alguns deles parecem ser apenas intermediários de rotas metabólicas das plantas (BECKMAN, 2000). Os fenóis são comumente produzidos através da rota do acetato/ melanato e do chiquimato em células especializadas distribuídas pelos tecidos, ao acaso ou em locais estratégicos. As enzimas que participam da síntese destes compostos estão associadas ao retículo endoplasmático, o que permite o armazenamento destes compostos em vesículas na sua forma original ou glicosilada, assim que são formados. A compartimentalização é fundamental para o funcionamento da célula, pois estes compostos são tóxicos e devem ser mantidos na sua forma reduzida. A liberação de fenóis pode levar a sua rápida oxidação por peroxidases em resposta a infecção. Fenóis que se mantêm livres no citoplasma podem ter ação tóxica tanto sobre o patógeno como sobre a própria célula vegetal e contribuir para reação de hipersensibilidade (HRAZDINA, 1994; ISAAC, 1992).

Os compostos fenólicos, como dito anteriormente, são substâncias relacionadas à defesa das plantas. Estas substâncias são conhecidas como potentes fungicidas, antibactericidas e antiviróticas (FRIEND, 1981). Por tanto, os fenóis são considerados parte do arsenal de defesa das plantas podendo contribuir com o isolamento de um patógeno ainda no sítio de infecção.

O acúmulo de compostos fenólicos depende do patossistema, do nível de resistência do hospedeiro e no caso de resistência induzida, do indutor (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; DURRANT, DONG, 2004). A resistência do milho a *Cochliobolus heterostrophus* é devido a presença do gene *rhm* que está envolvido na produção de fenilpropanóides (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

Enzimas como a álcool cinamil desidrogenase (CAD), a fenilalanina amônia-liase (FAL) e as peroxidases possuem papel importante na via dos fenilpropanóides. O aumento de FAL está freqüentemente associado ao aumento da concentração de fenilpropanóides. O aumento na atividade da CAD em trigo infectado pelo vírus do mosaico da estria do trigo é acompanhado pelo aumento na concentração de fenóis livres e ligados, entretanto, a atividade de FAL se mantém inalterada (KOFALVI; NASSUTH, 1995). Estes fatos mostram que apesar destas enzimas fazerem parte de uma mesma via, o aumento da atividade de uma não acarreta no aumento da atividade da enzima da mesma rota. Foi observado em tecidos de sorgo tratados com elicitores extraídos de *Saccharomyces cerevisiae* o aumento na síntese de fitoalexinas fenólicas, produzidas pela via dos fenilpropanóides (WULFF; PASCHOLATI, 1999) e alterações de peroxidases (RONCATO; PASCHOLATI, 1998), entretanto o mesmo tratamento não leva o aumento na síntese da FAL (KAMIDA et al., 2000).

1.6.2 Fitoalexinas

Fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular produzidos pelas plantas em resposta ao estresse e fazem parte da barreira química responsável pela resistência de plantas ao ataque de microorganismos causadores de doenças. Essas substâncias englobam vários grupos de compostos naturais como, flavonóides, cumarinas e alguns terpenóides. Embora a maior parte das fitoalexinas seja formada por compostos fenólicos existem fitoalexinas inorgânicas (BRAGA; DIETRICH, 1987).

O acúmulo das fitoalexinas pode ser induzido por organismos vivos, pelos seus produtos (eliciadores) ou ainda, por agentes químicos, como sais de metais

pesados. Embora os efeitos acentuados sejam sobre fungos, as fitoalexinas exibem toxicidade contra organismos procarióticos e eucarióticos, incluindo neste caso plantas superiores (BRAGA; DIETRICH, 1987).

Células de macieira resistentes a *Venturia inaequalis*, tratadas com elicitor fúngico, apresentaram a produção de seis compostos fenólicos que não foram produzidos pelo cultivar suscetível. Um destes compostos é produzido na forma glicosilada e é mantido em alta concentração até 96 hs após a elicitação. Esse composto foi identificado como malusfuran e classificado como fitoalexina (HRAZDINA et al., 1997).

1.6.3 Proteínas Relacionadas a Patogênese (PRs)

As proteínas relacionadas a patogênese são moléculas envolvidas em resistência induzida e começaram a ser estudadas no início da década de 70 por Van Loon. Hoje se sabe que estas proteínas são produzidas por diversas plantas como resposta a infecção por patógenos, participando ativamente no fenômeno de resistência induzida tanto por fatores bióticos como abióticos (STICHER et al., 1997; BOLLER et al., 1990; SHAH et al., 1997). A nomenclatura para as PRs foi proposta por Van Loon et al (1994). As mais comumente estudadas são PR-1, PR-2 (β -1,3-glucanases), PR-3 (Quitinases), PR-5 (Osmotina) e PR-9 (Peroxidase).

O primeiro grupo (PR-1) sem atividade biológica conhecida, não induzem resistência a vírus, mas ao fungo *Peronospora tabacina*, quando superexpressas em plantas transgênicas de tabaco. Já as proteínas PR-2 e PR-3 têm ação enzimática: as PR-2 são glucanases que decompõe glucanas e as PR-3 são quitinases que degradam quitina. Como as glucanas e quitina são os principais componentes de paredes de fungos, acredita-se que as PR-2 e PR-3 protegem as plantas contra infecção por fungos. As PR-5 estão relacionadas com inibição de enzimas digestivas, como alfa-amilase e tripsina, de fungos, insetos e bactérias e as PR-9 são peroxidases e estão ligadas a lignificação das paredes celulares (MARGINS-PINHEIRO et al., 1999).

As PRs acumulam-se em locais de infecção e em locais distante destes, em casos de indução sistêmica e sua síntese e acúmulo possuem caráter de resposta ativa e de sistemicidade em casos de resistência induzida. Dependendo da planta e do indutor as PRs acumulam-se tanto nos espaços intercelulares (que teriam uma ação direta sobre o patógeno) como em vacúolos (teriam ação após eventos de patogênese que culminam com descompartimentalização) (STICHER et al., 1997; BOL et al., 1990; LAWRENCE et al., 1996; VAN LOON, 1997; UKNES et al., 1992; VAN LOON, 1983).

As PRs podem também promover a liberação de elicitores de fitoalexinas como induzir a síntese de compostos fenólicos (BOLLER et al., 1990; VAN LOON, 1983; KUC, 1985; NEUENSCHWANDER et al., 1995).

1.6.3.1 Peroxidases

As peroxidases (PR-9) são enzimas que participam de vários processos fisiológicos. Entre as reações que participa, está a produção de lignina (Figura 2; pág. 37). A peroxidase catalisa a oxidação e polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxidos de hidrogênio (GRIESEBACH, 1981; STRACK, 1997; ALBELLES; BILES, 1991). Ela também participa da incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina à parede celular (TENHAKEN et al., 1995) e destruição peroxidativa do ácido indol-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 1990) e de outros reguladores de crescimento (BRARZ; KOSTER, 1981). As peroxidases participam ainda da biossíntese do etileno (ASADA, 1992), da oxidação de compostos fenólicos, que acumula em resposta a um elicitador (FRY, 1986). A atividade desta enzima pode ser alterada em função da resistência ou susceptibilidade de diferentes hospedeiros na presença de diferentes patógenos ou elicitores (ASADA, 1992).

As reações ocorrem em diversas partes da célula. A formação de lignina assim como a produção de H_2O_2 ocorre próxima à parede celular onde estão localizadas as peroxidases (STRACK, 1997). As peroxidases possuem papel importante nas respostas de defesa das plantas, pois atuam na lignificação e no

espessamento da parede celular em resposta ao ataque de patógenos (VANCE et al., 1980).

A atividade da enzima está relacionado a resistência de cultivares sendo relatado que o aumento da atividade é maior em cultivares mais resistentes. Shimoni et al (1991) mostraram que a atividade da peroxidase aumentou mais rapidamente em cultivares resistentes de milho à infecção por *Exserohilum turcicum*, do que nos suscetíveis.

1.6.3.2 Proteína NPR1

A enzima NPR1 está ligada a via de defesa da planta induzindo genes de defesa ligados a RSA.

O gene *npr1* é constantemente expresso e sua expressão é aumenta quando há o tratamento com ácido salicílico (Figura 1; pág. 17) (CAO et al., 1994; SHAH et al., 1997; CAO et al., 1998).

O ácido salicílico é capaz de se ligar diretamente à proteínas, principalmente proteínas antioxidantes contribuindo assim para o acúmulo de espécies reativas de oxigênio causando uma redução no meio citoplasmático. A proteína NPR1 é composta por complexo químico formado por pontes dissulfeto. O ácido salicílico é capaz de ativar esta enzima após a redução do meio que causa a quebra das pontes dissulfeto liberando o monômero NPR1 que é a forma biologicamente ativa, esta forma se liga a fatores de transcrição conhecidos como TGAs que induzem a expressão de genes relacionados a defesa da planta (MOU et al., 2003; ZHANG et al., 1999; DESPRÉSS et al., 2000.)

1.6.4 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A explosão oxidativa é uma resposta de defesa das plantas após o reconhecimento do patógeno. Esta "explosão" consiste na produção de espécies reativas ou ativas de oxigênio (EROs ou EAOs) e nitrogênio (ERN) como o

superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e o óxido nítrico (ON).

Estas moléculas ativas são produzidas também por estresses abióticos como altas temperaturas, radiação UV, exposição ao ozônio, desidratação e seca (MACKERNESS et al., 2001; GUAN et al., 2000; LANGEBARTELS et al., 2000; PRASAD et al., 1994).

As plantas possuem um arsenal rápido e eficiente de respostas de defesa contra patógenos que é iniciado com a explosão oxidativa. As espécies reativas de oxigênio como o superóxido (O_2^-), são moléculas essenciais nas vias de defesa da planta.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas em relações planta-patógeno compatíveis e incompatíveis, no local da penetração e durante o estabelecimento da RSA. As EAOs estão relacionadas principalmente com o enrijecimento da parede celular, devido ao aumento da lignificação e à formação de ligações cruzadas por glicoproteínas ricas em hidroxiprolina.

As espécies reativas de oxigênio também estão relacionadas com a regulação de genes de defesa, incluindo enzimas antioxidantes, no estabelecimento da reação de hipersensibilidade (RH), na peroxidação de lipídios e por sua ação antimicrobiana direta (CHAMNONGPOL et al., 1998; GREENBERG, 1998; LOW; SCHROEDER, 1997; RICCI, 1997; TENHAKEN, 1995).

1.6.4.1 Superóxido

O superóxido é o primeiro produto da explosão oxidativa na maioria das espécies de plantas, este possui um curto tempo de vida e rapidamente é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DANGL, 1998).

Esta molécula pode ser produzida na planta por vários mecanismos, como a ativação de NADPH-oxidases/sintases ligadas à membrana, peroxidases da parede celular, lipoxigenases (LOX) e como transferência de elétrons da mitocôndria ou cloroplasto. O superóxido oxida várias moléculas orgânicas como o ascorbato e metais como o ferro (BREUSEGEM et al., 2001).

1.6.4.2 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é uma molécula tóxica em altas concentrações e está relacionada com a indução da célula à morte (DANGL, 1998). A sua produção se dá a partir da reação superóxido catalisada pela superóxido desmutase (SOD). É uma molécula estável e, por não apresentar carga, difunde-se rapidamente pela camada lipídica da membrana celular, favorecendo a rápida elicitação da planta. Por ser altamente tóxica a célula vegetal, estas são degradadas por enzimas antioxidantes como catalase (CAT) que dismuta o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, e a peroxidase (POX), onde o peróxido de hidrogênio serve como substrato para síntese de lignina (APOSTOL et al., 1989, LEBEDA et al., 2001).

1.6.4.3 O Íon hidroxila

O Íon hidroxila (OH^-) possui meia-vida curta (< 1 ms) e são muito tóxicas, reagindo com biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, além disto, é capaz de aumentar a permeabilidades de membranas. Pode ser produzido na conversão do H_2O_2 na presença de Fe^{2+} (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998; MOLLER, 2001).

1.6.4.4 Óxido nítrico

Além das espécies reativas de oxigênio (EAOs), foi descoberta recentemente a produção de espécies reativas de nitrogênio durante a HR. Encontrou-se ainda uma relação de sinergismo entre as EAOs e o ON na sinalização de respostas de defesa (BOLWELL et al., 1999; DAT et al., 2000; DURNER et al., 1999; FOYER et al., 1997; NEILL et al., 1999).

O ON é uma molécula sinalizadora intra e intercelular, participando de diversos processos na planta, como a fotomorfogênese, a expansão foliar, o

crescimento de raízes, a senescência, além de induzir a produção de fitoalexinas e etileno (DELLEDONE et al., 1998; DURNER; KLESSING, 1999; DURNER et al., 1997). O óxido nítrico em sinergismo ao peróxido de hidrogênio também está relacionado a indução da morte celular (DELLEDONNE et al., 2001; DE PINTO et al., 2002). Vários estudos sugerem que o ON é capaz de regular a resposta de hipersensibilidade e induzir a apoptose, ou seja, a morte celular, (Figura 1; pág. 17), entretanto é observada uma bifuncionalidade modulador da morte celular sendo capaz de estimular a apoptose e de reverter tal processo através da indução de genes que produzem proteínas antioxidantes. Delledonne et al (2001) mostraram que o nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de óxido nítrico, em concentrações entre 0.1 mM a 0.5 mM induziu células à morte. Entretanto altas concentrações de SNP (acima de 5 mM) causaram a redução na morte celular. A determinação do programa de morte celular depende do equilíbrio entre o ON e EAOs, com isto é observado que o ON possui papel tóxico e protetor.

Junto com a geração de EAOs, o ON é produzido nos tecidos das plantas em resposta a patógenos (DELLEDONNE et al., 1998; DURNER et al., 1999). Clarck et al (2000) mostraram que houve aumento na produção de H_2O_2 e ON em cultura de células de *Arabidopsis thaliana* quando estas foram expostas a estipes não virulentas de *Pseudomonas syringae*. Foi também encontrado um aumento na produção de ON na epiderme de tabaco induzido por um elicitor (FOISSNER et al., 2000).

Ainda não foi encontrada uma enzima específica de síntese do óxido nítrico (NOS) em plantas. A produção conhecida é realizada pela enzima redutase do nitrato e xantina oxidoreductase. A redutase do nitrato gera NO em condições aeróbicas tendo o nitrito como substrato, já a xantina oxido redutase considerada uma geradora de EAOs, parece produzir ON em condições aeróbicas mais o processo de produção não está bem esclarecido (MILLAR et al., 1997; YAMASAKI et al., 2000).

O papel do ON como molécula sinérgica ao H_2O_2 na HR, carece de investigação. Atualmente é grande a busca por uma NO sintase (NOS) em plantas, enzima já detectada em células animais.

O óxido nítrico, assim como as EAOs, é capaz de alterar a expressão de genes relacionados a defesa como PR1 e PAL em tabaco e soja (DELLEDONNE et al., 1998; DURNER et al., 1998).

O ON coopera com as EAOs na indução da resposta de hipersensibilidade e apoptose celular e funciona independente na indução de vários genes de defesa à patógenos como proteínas do metabolismo de fenilpropanóides onde há produção de lignina, peroxidases, SODs, catalases, fitoalexinas e ácido salicílico (DELLEDONNE et al., 1998; DURNER, 1998; HUANG et al., 2002).

Embora as EAOs e o ON façam parte de respostas de defesa nas plantas, o seu acúmulo na célula é prejudicial. Para evitar este acúmulo, a célula dispõe de vários mecanismos para detoxificar, sendo bem conhecido as moléculas e enzimas antioxidantes. Dentre as moléculas antioxidativas está o β -caroteno, eficiente detoxificante de O_2 , participando do sistema antena dos cloroplastos, na absorção de luz e na transferência de energia para os centros de reações, podendo dissipar energia durante o estresse fotoxidativo (BAKER; ORLANDI, 1999). Entre as enzimas antioxidativa encontramos a superóxido desmutases (SOD), as catalases (CAT), as peroxidases (POX) e ascorbato/glutathione.

1.6.5 Enzimas antioxidantes

1.6.5.1 Superóxido desmutases (SOD)

As superóxido desmutases (SOD) são capazes de dismutar o O_2^- em HO_2^+ e H_2O_2 (Figura 1; pág. 17) e podem estar ligadas a um metal (Cu/Zn, Mn e Fe). As plantas possuem Cu/Zn- SOD no citosol, Cu/Zn e/ou Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria, principal sítio de produção de EAOs na célula vegetal (BAKER; ORLANDI, 1995).

1.6.5.2 Catalases

As catalases são consideradas as principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 convertendo este em O_2 e H_2O . As plantas possuem várias isoformas presentes nos peroxissomas e glioxissomas. As catalases podem ser divididas em três classes: classe 1, que está ligada a detoxificação do H_2O_2 nos tecidos fotossintéticos durante a fotorrespiração; classe 2 produzidas em tecidos vasculares e com função de lignificação; e classe 3, que constituem as catalases cuja atividade está relacionada com remoção de H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM et al., 2001).

Dixon et al (1994) demonstraram que a adição da catalase e do ácido ascórbico, potentes antioxidantes, bloqueou o acúmulo da fitoalexina gliceolina em plantas de soja elicitadas por *Verticillium dahliae*. Os patógenos também produzem e armazenam catalases, possivelmente para inibir a explosão oxidativa das plantas assim como a produção de fitoalexinas e a ação de H_2O_2 na indução da morte celular durante a resposta de hipersensibilidade.

1.6.5.3 Ciclo da ascorbato/glutationa

É considerado o principal sistema de detoxificação das EAOs nos cloroplastos. Neste sistema estão envolvidas 4 enzimas: ascorbato peroxidase (APX), que reduz e remove o H_2O_2 na presença de ascorbato como redutor; dehidroascorbato redutase (DHA), a monodehidroascorbato redutase (MDA) e glutaciona redutase (YOSHIMURA et al., 2000) (Figura 2).

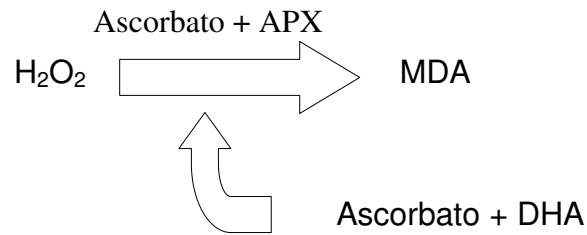


Figura 2 - Representação do ciclo da ascorbato/glutationa

1.6.6 Acúmulo de Carboidratos

O estresse abiótico, assim como o biótico pode causar alterações na disponibilidade de carboidratos necessários ao crescimento da planta e a manutenção das rotas de biossíntese de compostos fenólicos.

Horsfall et al (1957) demonstraram que a susceptibilidade de plantas está ligada a concentração de açúcares em tecidos foliares. Baseado nestes fatos as doenças foram classificadas em: doenças de baixa ou e de alta concentração de açúcares, sendo esta classificação modificada posteriormente para processos infecciosos ligados à baixa concentração de açúcares (VANDERPLANK, 1984).

O acúmulo de carboidratos pelas plantas é considerado uma adaptação fisiológica contra os efeitos da patogênese. Baixas concentrações de açúcares em plantas é relacionado a resistência do patógeno as respostas de defesa da planta, já uma maior concentração destes açúcares torna a planta mais resistente ao ataque de patógenos (VANDERPLANK, 1984).

Salzman et al (1998) demonstraram que o acúmulo de hexoses em videira (*Vitis labruscana* cv Concord) é acompanhado com acréscimo de proteínas com funções antimicrobianas.

Herberts et al (1996) sugerem que certos açúcares também estão envolvidos nos mecanismos de transdução dos sinais que induzem a transcrição de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PRs), bem como a repressão das enzimas envolvidas na fotossíntese.

Os açúcares solúveis foram relacionados à indução de genes relacionados a resposta de defesa como: inibidor de proteinase (JOHNSON; RYAN, 1990), chalcone sintase, ativação de EAOs (TSUKAYA et al., 1991) e PR3 (HERBERS et al., 1995).

Foi demonstrado também que altos níveis de açúcares podem reprimir a expressão de genes patogênicos de certos fungos, além de favorecer a atuação de proteínas antifúngicas das plantas (SALZMAN et al., 1998).

Alguns estudos mostram que a resistência de plantas ao ataque de patógenos está associada ao acúmulo ou a redução de açúcares (VANDERPLANK, 1984). Foi detectado que um decréscimo na concentração de açúcares causava baixa na resistência à doenças em tomate (HORSFALL, 1975) algodão (EATON; RIGLER, 1946) e milho (HOLBERT et al., 1935). Níveis moderados de açúcares causam colonização por parte de patógenos, entretanto níveis altos levam ao decréscimo e susceptibilidade da planta. Este fenômeno é conhecido como resistência induzida por altos níveis de açúcar e isto é devido à mudanças osmóticas nos patógenos que tentam colonizar estas plantas (VANDERPLANK, 1984; HORSFALL; DIMOND, 1957).

Açúcares base para produção da parede celular (celulose), compostos fenólicos e lignina (Figura 3)

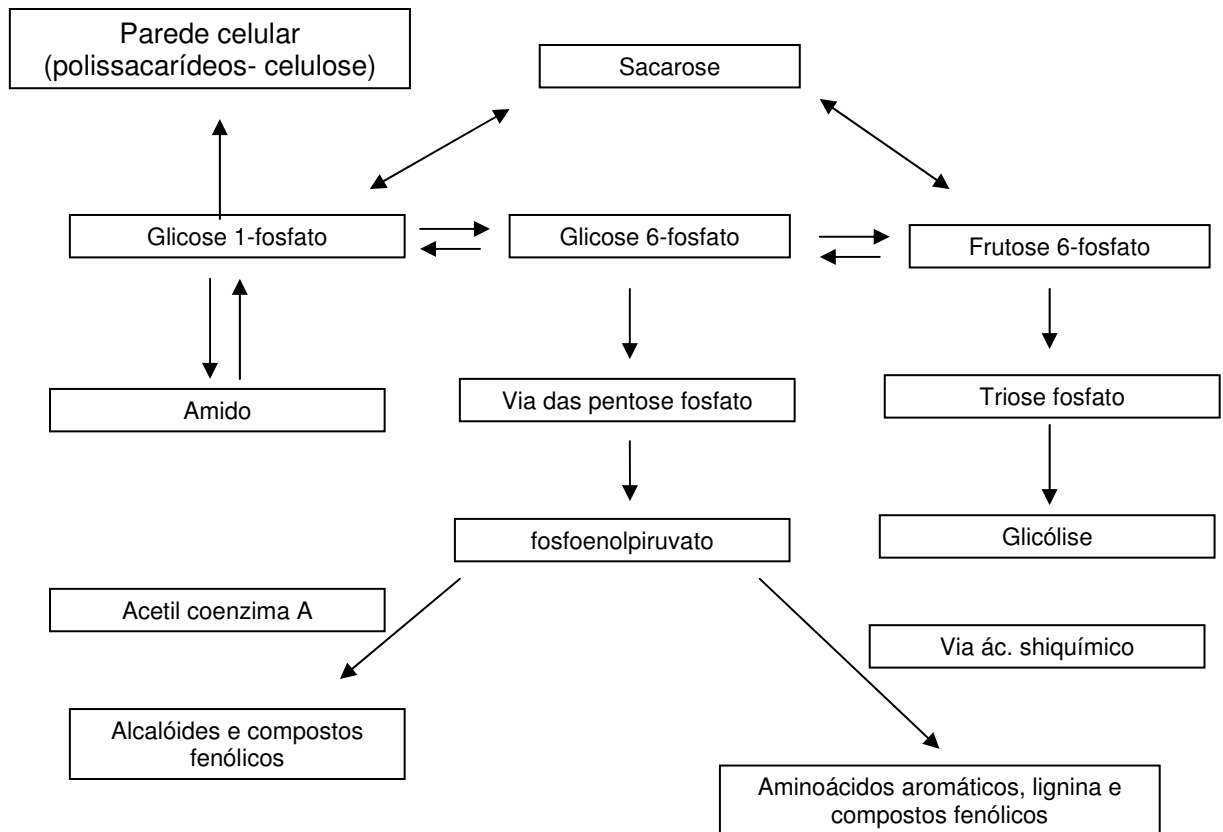


Figura 3- Esquema representando as vias de síntese de alcalóides, compostos fenólicos, aminoácidos aromáticos e lignina tendo como precursor os açúcares.

1.7 A IMPORTÂNCIA DE ESTUDOS DE INDUÇÃO DE RESPOSTAS DE DEFESA

É de grande interesse agrícola, a ativação dos mecanismos da defesa de plantas para conferir características de interesse agrônomo, como aumento da resistência a patógenos e estresses ambientais. Técnicas de engenharia genética permitem a ativação de respostas de defesa, através da transferência de genes de diferentes organismos para vegetais de interesse agrícola, entretanto, seu uso possui sérias restrições. O uso de substâncias que tornam as plantas mais resistentes tem ganhado campo nas pesquisas de indução de resistência por não

apresentar tantas restrições como o uso de organismos manipulados geneticamente. Assim é de grande relevância compreender como as plantas se defendem, estudando o papel de diferentes componentes desta complexa rede de eventos para que se possa manipular a reação de hipersensibilidade (RH) e a resistência sistêmica adquirida (RSA), tornando as plantas mais resistentes. Portanto, conhecer tanto a complexa seqüência de sinais que leva à RH e a RSA quanto sua regulação é essencial para desenvolver novas estratégias de controle das doenças vegetais.

2 OBJETIVOS

Avaliar a indução de sistema de defesa em mamoeiro como resposta à elicitores químico (óxido nítrico) e biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) através de análise das respostas de defesa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As mudas das cultivares Golden e Sunrise Solo usadas nos experimentos foram obtidas nas fazendas experimentais do INCAPER, localizada nos municípios de Linhares e Sooretama, no estado do Espírito Santo.

As mudas foram retiradas dos tubetes e transplantadas para vasos contendo uma mistura de terra orgânica e areia (3:1 v/v). As plantas foram irrigadas duas vezes por semana e cultivadas em telado para aclimação.

3.2 TRATAMENTO COM ÓXIDO NÍTRICO (ON)

Para análise do efeito do óxido nítrico (ON), as mudas de mamoeiro foram tratadas através da pulverização com 5 mL da solução de nitroprussiato de sódio (SNP) 10 mM. Como controle, mudas das duas cultivares foram pulverizadas com o mesmo volume de água destilada. Foi utilizado o nitroprussiato de sódio (SNP) por este ser um doador efetivo do ON. As respostas de defesa foram analisadas 0, 72, 120 e 168 horas após o tratamento.

3.3 TRATAMENTO COM LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Foi utilizada uma suspensão com 200 g/L de fermento biológico fresco Fleishmann (Fleishmann LTDA, SP, BR). A solução foi autoclavada por cerca de 30

minutos à 121 °C (1 atm). As plantas foram pulverizadas com 10 mL da solução. As respostas de defesa foram analisadas 0, 72, 120 e 168 horas após o tratamento.

3.4 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE DEFESA

3.4.1 Dosagem do teor de compostos fenólicos – taxa de lignificação dos tecidos.

A análise da concentração de fenóis totais foi feita utilizando o metanol como agente extrator e o reagente de Folin & Ciocalteu para determinar a sua concentração (GUZZO et al., 1999).

Para extração dos compostos fenólicos, 0,3 g de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e o pó foi ressuspensão em 4 mL de metanol à 50% e deixado em banho-maria por 1,5 h à 80°C. O extrato foi resfriado e centrifugado à 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado para dosagem dos fenóis livres. Ao pellet foi adicionado 2 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 0,5 M e incubado aproximadamente 24 hs para saponificação de fenóis ligados à parede celular. A reação foi neutralizada com 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2 M, o extrato foi centrifugado à 15.000 rpm por 15 minutos.

À 150 µL dos sobrenadantes (fenóis livres e ligados à parede) foi adicionado 3 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (2% m/v) e 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (1:1 v/v). Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (FENTO 482, USA) à 750 nm. A concentração de fenóis foi expressa em equivalentes de ácido clorogênico (mg) por g de tecido fresco. A curva padrão foi feita usando soluções de ácido clorogênico nas concentrações de 0, 20, 40, 50, 100 e 150 µg /mL.

3.4.2 Dosagem da atividade da peroxidase

A determinação da atividade de peroxidases foi realizada conforme Roncato e Pascholante (1998) com algumas modificações. 0,3 gramas de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 4 mL do tampão de extração (tampão fosfato 0,01 M; pH 6,0) à 4°C. O extrato foi centrifugado a 12.000 rpm por 25 minutos à 4°C e o sobrenadante coletado. À 60 µL do extrato vegetal (sobrenadante) foi adicionado 0,9 mL de tampão de reação (0,153 µL de H₂O₂ 30%, 0,125 µL de guaiacol em 50 mL de tampão de extração) e 40 µL do tampão de extração. A leitura foi feita à 470 nm e a atividade expressa em Abs. /min/mg de proteína

3.4.3 Determinação do conteúdo protéico total

O conteúdo protéico da muda foi determinado segundo o método de Lowry (1951) e a leitura feita em espectrofotômetro (FENTO, 482, USA) à 660 nm. Para preparação do extrato bruto protéico (EBP), 0,3 gramas de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido, ressuspensas em 4 mL do tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) a 4°C. O extrato foi centrifugado a 12.000 rpm por 25 minutos à 4 °C e o sobrenadante coletado. Para dosagem foi utilizado o reagente de cobre composto por: 48 mL da solução de carbonato de sódio 3% em NaOH 0,1 M, 1 mL de tartarato de sódio e potássio 4% e 1 mL de sulfato de cobre 2%. À 1 mL do EBP foi adicionado 5 mL do reagente de cobre. Após 10 minutos, foi adicionado 500 µL do reagente de fenol, que consiste em 1 volume de reagente de Folin-Ciocalteu e 2 volumes de água destilada. Após 10 minutos foi realizada a leitura à 660nm.

Para determinação da concentração foi utilizado uma curva de calibração feita a partir de alíquotas (25, 50, 100 e 150 µL) de padrão de albumina de soro bovino na concentração de 1mg/mL.

3.4.4 Determinação da concentração de frutose, sacarose e carboidratos totais

O método escolhido para as dosagens de açúcares solúveis totais, açúcares redutores (glicose e frutose) e sacarose foi o do reagente de antrona (McCREADY et al., 1950).

3.4.4.1 Preparo do extrato bruto para dosagem de carboidratos

1 grama de folha foi mergulhada em 10 mL de etanol 80 % fervente por 3 minutos e depois triturada e incubada à 80°C em banho-maria por 30 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e o pellet submetido à mais duas repetições das etapas anteriores.

Com o término das três extrações utilizando o etanol, os sobrenadantes foram misturados e reservados.

O pellet, após as três extrações com etanol foi ressuspenso com 15 mL de água e este foi levado para mais uma extração em banho-maria à 60 °C por 30 minutos. O conteúdo foi então centrifugado e o sobrenadante separado. Este passo foi repetido mais uma vez. Os sobrenadantes (fração etanólica e aquosa) foram misturados e rotoevaporados a uma temperatura de 60 °C, com rotação de 7 rpm até atingir o volume de 5 mL. O extrato bruto concentrado (EBC) foi mantido à – 20°C até análise dos seus conteúdos.

3.4.4.2 Dosagem de carboidratos totais

A concentração de carboidratos solúveis totais foi determinada a partir de 50 µL do EBC, 200 µL de água e 2,5 mL de solução de antrona 0.2%. As amostras foram incubadas à 100 °C em banho-maria por 10 minutos e deixadas no escuro por

20 minutos. As amostras foram lidas à 620 nm. A curva padrão foi feita a partir de soluções de glicose à 50, 100, 150 e 200 mg/dL.

3.4.4.3 Dosagem de açúcares redutores

Para dosagem foi utilizado 50 µL da amostra EBC, 250 µL de água destilada e 2,5 mL de antrona 0,2% (76 mL de ácido sulfúrico, 24 mL de água e 0,2 gramas de antrona). As amostras foram misturadas em um agitador de tubo tipo Vortex e em seguida incubadas 37°C, em banho-maria, por 45 minutos. Procedeu-se, então, leitura em espectrofotômetro (FENTO 482, USA) à 620 nm para determinação da concentração de açúcares redutores. Foi utilizado como padrão uma solução de glicose (monossacarídeo) em concentrações crescentes de 50 a 200 mg/dL.

3.4.4.4 Dosagem de sacarose

A sacarose foi dosada utilizando 100 µL do EBC, 250 µL de água, 100 µL de KOH 5,4 M e 3 mL de antrona 0,2%. A leitura foi feita à 620 nm. A curva padrão foi feita utilizando soluções de sacarose de 50, 100, 150 e 200 mg/dL.

3.4.5 Análise da expressão gênica

3.4.5.1 Oligonucleotídeos

Para análise da expressão gênica em *Carica papaya* foram desenhados primers a partir do programa *on line* (www.genome.wi.met/edu/cgi.bin/primerecg1)

PRIMER 3 Input (primer3.cgi.v.0.2c), cujos oligonucleotídeos desenhados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos, organismo de origem e suas respectivas seqüências

Oligonucleotídeo	Organismo de origem	Seqüências	
		sentido 3'- 5'	sentido 5'-3'
SOD-Mn	<i>Carica papaya</i>	agttctttgggctgggagat	cccaaacatctatgccagt
NPR1	<i>Carica papaya</i>	cttgcaaaagctggtgatga	gcaagaccaagggaaatgaa
Peroxidase	<i>Nicotiana tabacum</i>	ttttccacatctggatctgc	aggggcctaaacaacacaag
Actina	<i>Nicotiana tabacum</i>	atctgctgaacgggaaattg	tgatggctggaagagaacct

3.4.5.2 Extração de RNA

O RNA vegetal foi extraído segundo Dodds e Joseph (1983) e Valverde, (1990).

1º: Preparação do material

Foram usados cuidados especiais para evitar a degradação do RNA a ser extraído, como: o grau e o pistilo foram deixados de molho em SDS 10% 15 minutos antes de começar o experimento, depois foram lavados com água destilada e secos em papel toalha. As bancadas foram limpas com água e

sabão e as pinças e espátulas foram limpas e esterilizadas. Todos os materiais usados estavam estéreis e/ou novos, sendo os reagentes utilizados de alta pureza.

2º: Extração de Material Genético

500 µg de tecido vegetal (folhas de mamão) foi macerado em nitrogênio líquido com pistilo e grau. O tecido macerado foi ressuscitado em 1 mL de tampão de CTAB (CTAB 2% p/v; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 20 mM EDTA; 1% β-mercaptoetanol (v/v), polivinilpirrolidona (PVP) 1%, pré aquecido à 65°C, misturado e agitado.

As amostras foram incubadas em banho-maria à 65°C por 30 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante submetido a extração com 500 µl de fenol:álcool isoamílico (24:1) e vortexado rapidamente.

O material foi então centrifugado por 10 minutos e o sobrenadante coletado e a extração com fenol: álcool isoamílico foi repetida mais duas vezes.

As amostras foram então misturadas e centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo e submetidos a nova extração com clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 min à 4°C e o sobrenadante coletado e transferido para novo tubo.

Para precipitar o material de interesse foi utilizado 1,0 mL de etanol absoluto gelado. A mistura foi incubada à - 20° C durante à noite. Após este tempo o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 1 h 4°C e descartado o sobrenadante. O pellet (precipitado) foi lavado com 1,5 mL de etanol 70%, o excesso de álcool foi retirado cuidadosamente e o tubo foi mantido no gelo durante a evaporação do etanol. As amostras foram ressuscitadas em 20 µl de água ultra-pura estéril e o conteúdo de RNA dosado à 260 nm.

3.4.5.3 Tratamento Enzimático

Após as dosagens, a quantidade de RNA foi ajustada para 1µg/µL de RNA e estas foram tratadas com DNase. Foi utilizado 1µg da enzima por µL de DNA. As amostras foram incubadas à 37°C por 20 minutos. Após o tratamento enzimático a enzima foi inativada 65°C por 10 minutos.

3.4.5.4 Reação de RT para obtenção do DNA complementar (cDNA)

Após tratamento com a DNase as amostras foram submetidas a reação da transcriptase reversa (RT).

Foram coletados 2 µl de RNA extraído e colocados em um microtubo no qual foram adicionados 1 µl da mistura de nucleotídeos (dNTPs) 10 mM, 1 µl de hexameros randômicos e 6 µl de água DEPC, tendo como volume final 10 µl. A tabela 2 apresenta as misturas feitas.

Tabela 2 - Componentes da reação de RT para obtenção do cDNA

<i>Componente</i>	<i>Amostra (µl)</i>
RNA até 5µg	2
Mistura de dNTP 10 mM	1
Hexameros randômicos	1
H ₂ O DEPC qsp	10

Após completar o volume para 10 µL as amostras foram incubadas a 65 ° C por 5 minutos, e incubadas no gelo por 1 minuto. 9 µl da mistura de reação (2µL de

tampão RT 10X, 4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2 μ L de DTT 0,1M e 1 μ L de inibidor de RNase) foi adicionada a cada mistura RNA/oligonucleotídeos (10 μ L) e então misturada, centrifugada rapidamente e incubada a 42°C por 2 minutos. Em cada tubo, foi adicionado 1 μ l (50 unidades) da enzima RT. Misturado e incubado a 42°C por 50 minutos. Após, a amostra foi incubada a 70°C por 15 minutos e rapidamente colocada no gelo.

3.4.5.5 Reação em cadeia de Polimerase (PCR)

1 μ l das amostras da reação de RT foram coletadas e foi adicionado à 0,25 μ L de nucleotídeos (dNTPs), a 1 μ L da enzima Taq DNA (5U/ μ L), 1,25 μ L Tampão de reação presente no kit para PCR (SIGMA, SP, BR), MgCl₂ (50 mM) e água DEPC 9,175 μ L, colocando-se 1 μ L dos oligonucleotídeos (primers) adequados.

As amostras foram levadas para o termociclador (Eppendorf, Alemanha) e foi utilizada a seguinte programação: 1) 94°C por 4 minutos; 2) 94°C por 1 minuto; 3) 60°C por 1 minuto; 4) 72°C por 1 minutos; 5) Retorno ao tempo 2 por mais 30, 35 ou 40 vezes; 6) 72°C por 5 minuto; 7) 4°C por 10 minutos; 8) – 20° C para armazenar

3.4.5.6 Análise da temperatura média de anelamento dos oligonucleotídeos (T_m)

A temperatura média de anelamento (T_m) dos oligonucleotídeos foi testado fazendo-se o RT-PCR a partir do material genético extraído DNA e RNA. A temperatura média usada para amplificação com oligonucleotídeos foi de 60°C.

3.4.5.7 Eletroforese em gel de Agarose

O gel de agarose à 2% foi feito em tampão TAE (Tris acetato e EDTA 1X). A mistura foi levada ao microondas até a agarose ser completamente dissolvida e derramada na cuba.

Preparo das amostras: à 10 μ L das amostras foi adicionado 5 μ L de tampão de corrida (corante de azul de bromofenol (0,05% p/v) e glicerol (10%). As amostras foram submetidas a corrente elétrica de 100 volts por 40 minutos. O gel foi corado usando brometo de etídio (0,001%) e as bandas correspondentes aos genes amplificados foram observados ao transiluminador UV 280 nm.

3.4.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 2 cultivares, 2 tratamentos e 3 repetições sendo repetido três vezes no tempo. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico SAEG (versão 4.0). Para comparação das médias foi realizados o teste de Tukey com 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TEOR DE FENÓIS LIVRES E LIGADOS À PAREDE CELULAR

O aumento dos teores de compostos fenólicos tem sido relacionado com a atividade antimicrobiana em resposta ao tratamento com indutores de resistência ou à presença de patógenos. Desta forma, foi analisada a capacidade do extrato de levedura *S. cerevisiae* e do NO como indutores de respostas de defesa, através da análise de variação nas concentrações de fenóis livres e ligados a parede celular.

A levedura *S. cerevisiae* foi capaz de induzir o aumento de compostos fenólicos livres e ligados à parede celular nas duas cultivares de mamoeiro testadas. Na cultivar Golden, a maior diferença da concentração de fenóis livres e ligados ocorreu 72 hs após o tratamento (Figura 3 A ; Tabela 3). A concentração de fenóis livres após 72 hs foi 39% maior que o controle, já o aumento nos fenóis ligados foi de 35% após 72 hs. O teor de fenóis livres e ligados não variaram do controle após 168 hs. Na cultivar Sunrise Solo, o tratamento com levedura não induziu o aumento da concentração de compostos fenólicos livres em nenhum dos tempos testados (Figura 3 B; Tabela 3). Nos fenóis ligados houve um aumento de 30% após 120 horas de tratamento com o extrato, não havendo diferença significativa nos demais tempos (Figura 3; Tabela 3).

Estes resultados estão de acordo com trabalhos de literatura que mostram que plantas de sorgo tratadas com extrato de *S. cerevisiae*, tiveram seu conteúdo de fenóis aumentado (WULFF; PASCHOLATI 1998). A levedura possui várias proteínas e carboidratos com atividade elicitora já descritos (PASCHOLATI, 1998) e esta se mostrou capaz de induzir pelo menos uma via de sinalização de resposta de defesa nas plantas de mamão testadas.

Em plantas de trigo também foi observado que plantas tratadas com elicitor fúngico tiveram os níveis de fenóis livres aumentados após 120 hs de tratamento. Entretanto, a concentração dos fenóis ligados foi menor que a dos fenóis livres e não apresentaram mudança significativa após o tratamento (KOFALVI; NOSSUTH, 1995). Da mesma forma, em algodão o tratamento com elicitor fúngico também resultou no acúmulo de fenóis livres e ligados (DUBERY; SLATER, 1996).

Alguns fenóis possuem ação fungitóxica direta, como é o caso da catequina produzidas em folhas de morango. Esta substância produzida em resposta à inoculação com um isolado não patogênico de *Alternaria alternata*, foi capaz de impedir a formação normal de hifa de penetração do patógeno virulento e inibir a manifestação dos sintomas de pinta-preta (YAMAMOTO et al., 2000). Outra substância fenólica é a epicatequina, presente em frutos imaturos de abacate. Esta substância inibe a ação da enzima liase do pectato produzida por *Colletotrichum gloeosporioides* e este, portanto não consegue desenvolver-se (WATTAD et al., 1994).

O ON foi capaz de aumentar a concentração de compostos fenólicos livres na cultivar Golden em todos os tempos testados, entretanto, não houve diferença significativa entre o teor de compostos fenólicos ligados. Após 72 hs e 120 hs o aumento na concentração de fenóis livres foi de 63% e de 36%, respectivamente. O maior aumento no teor de fenóis livres encontrados foi de 74% após 168 hs (Figura 4A).

A cultivar Sunrise Solo apresentou variação no teor de fenóis livres em todos os tempos avaliados. Após 72 hs este aumento foi de 30%, já em 120 e 168 hs foi de 31% e 52%, respectivamente. O teor de fenóis ligados aumentaram após 120 e 168 hs, sendo que após 120 hs o aumento foi 39%, sendo que este aumento diminuiu para 26% após 168 hs de tratamento (Figura 4B). Em Durner et al (1998) foi observado que o uso de doadores de óxido nítrico como o nitroprussiato de sódio (SNP) causa síntese da enzima fenil-alanina-amônia-liase (FAL), enzima da rota de biossíntese de fenilpropanóides que é a rota para síntese de lignina. O aumento da atividade de FAL está relacionado ao aumento da concentração de fenilpropanóides. Wang e Wu (2004) também encontraram um aumento na atividade de FAL em *Taxus chinensis* quando tratado com SNP mostrando que o NO parece regular a atividade de FAL e como consequência, a via dos fenilpropanóides.

A figura 4A e 4B mostra o aumento nas concentrações de compostos fenólicos pelo SNP e isto pode estar relacionado a um possível aumento da atividade de FAL. Plantas de milho resistentes ao fungo *Cochiobolus heterostrophus* possuem o gene *rhm* que está envolvido quase que exclusivamente na produção de fenilpropanóides (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT 1992).

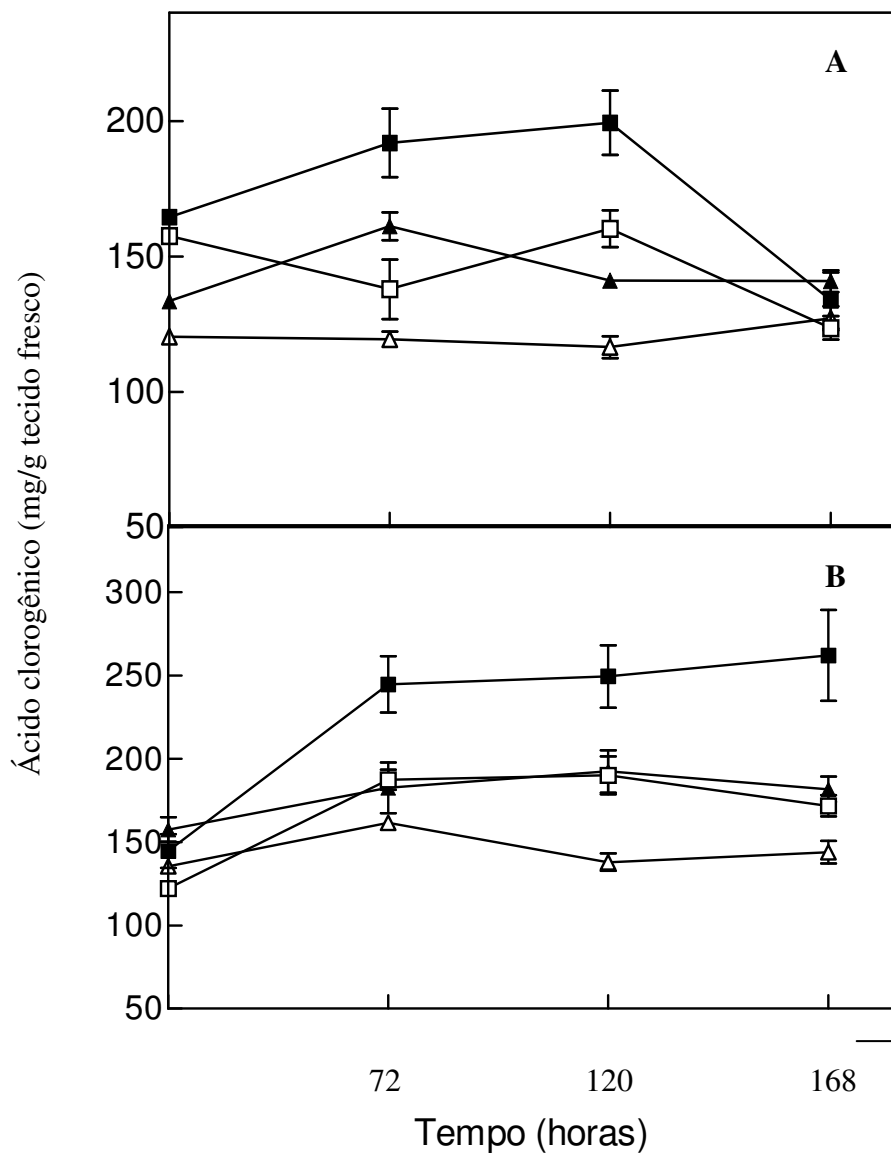


Figura 3-Teor de fenóis expressos em μg de ácido clorogênico em mudas das cultivares Golden (A) e Sunrise Solo (B) tratadas com extrato de levedura em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 horas). \square Fenóis livres em mudas tratadas com água destilada; \blacksquare Fenóis livres em mudas tratadas com extrato de levedura; \triangle Fenóis ligados em mudas tratadas com água com água destilada; \blacktriangle Fenóis ligados em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras representam o erro padrão

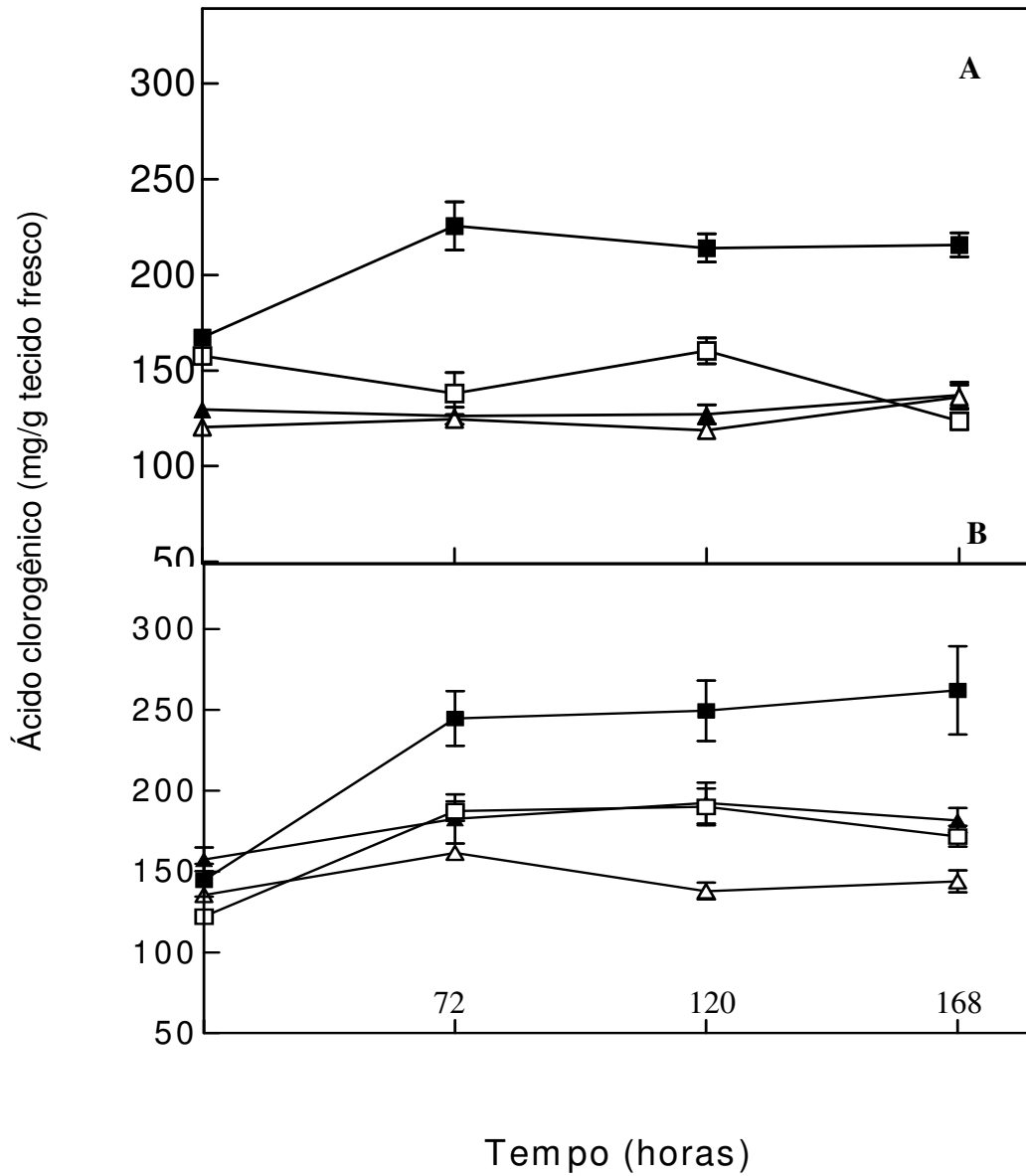


Figura 4 - Teor de fenóis expressos em μg de ácido clorogênico em mudas das cultivares Golden (A) e Sunrise Solo (B) tratadas com SNP em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 horas). \square Fenóis livres em mudas tratadas com água destilada; \blacksquare Fenóis livres em mudas tratadas com SNP; \triangle Fenóis ligados em mudas tratadas com água com água destilada; \blacktriangle Fenóis ligados em mudas tratadas com SNP. As barras representam o erro padrão

Os resultados demonstram que o SNP foi mais eficaz em elicitar a resposta de defesa através do acúmulo de fenóis livres e ligados nos dois cultivares (Figura 3A e 3 B; Tabela 3). Já o tratamento com extrato de levedura, não alterou o teor de compostos livres na cultivar Sunrise Solo e os fenóis livres só apresentaram aumento 120 hs após o tratamento (Figura 4A e 4B; Tabela 3).

A cultivar Golden mostrou-se mais eficiente com relação ao tempo levado para o acúmulo de fenóis livres e ligados, entretanto, tendo maior acúmulo de fenóis livres e ligados quando comparado ao cultivar Sunrise Solo. A resistência a determinado patógeno pode estar relacionado a capacidade da planta em produzir de forma eficaz substâncias de defesa.

A cultivar Sunrise Solo respondeu mais tardiamente ao estímulo dos elicitores tendo os aumentos de fenóis principalmente após 120 hs, tendo a sua concentração após este período maior do que a encontrada na cultivar Golden. Desta forma, os resultados indicam uma capacidade das duas diferentes cultivares de mamoeiro em responder ao elicitor.

Anwar et al (1995) demonstraram que plantas de milho e sorgo resistentes a *Peronoscleospora sorghi* apresentavam aumento quantitativo e qualitativo de fenóis. Resultados semelhantes foram encontrados por Musetti et al (2000) que verificaram o aumento na concentração de polifenóis totais quando plantas de ameixeira e macieira foram infectadas por fitoplasma, sugerindo que estas plantas estariam aumentando o teor de lignificação das paredes celulares como uma tentativa de impedir a penetração destes patógenos.

Tabela 3- Concentrações médias de fenóis livres e ligados nas cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com água (T1), SNP (T2) e extrato de levedura (T3)

Tempo (hs)	Tratamento	Fenóis Livres (mg/ g tecido fresco)		Fenóis Ligados (mg/ g tecido fresco)	
		Golden	Sunrise Solo	Golden	Sunrise Solo
0	T1	157.5 b ¹	112.8 b	120.3 b	135.4 b
	T2	167.2 b	127.0 b	129.5 b	137.4 b
	T3	164.6 b	118.4 b	133.6 b	137.2 b
72	T1	137.9 b	187 b	119.5 b	167.7 b
	T2	225.5 a	244.7 a	126.3 b	182.5 ab
	T3	191.9 a	185.7 a	161.2 a	162.7 b
120	T1	160.3 b	174.0 b	116.51 b	137.9 b
	T2	214.0 a	249.4 a	127.1 b	192.4 a
	T3	199.4 a	174.9 b	141.2 a	179.9 a
168	T1	123.6 b	170 b	127.2 b	130.6 b
	T2	215.6 a	262.1 a	137.1 b	181.7 a
	T3	133.8 b	170.1 b	140.9 b	141.9 b

¹ Medidas seguidas com a mesma letra , na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

4.2 ATIVIDADE DE PEROXIDASE

O acúmulo da enzima peroxidase e o aumento da sua atividade desta têm sido freqüentemente associados aos mecanismos de defesa de plantas, sendo esta uma enzima chave para expressão de resistência em muitas interações patógeno-hospedeiro (LEHERER, 1969).

O tratamento com levedura foi capaz de induzir o aumento da atividade enzimática em ambas cultivares avaliadas (Figura 5A e 5B). O aumento deu-se após 72 hs de tratamento e este foi progressivamente aumentado com o tempo, indicando que a levedura *S.cerevisiae* induz mecanismos de defesa não específicos e esta indução está provavelmente ligada à proteínas e carboidratos presentes em sua parede celular (WULFF; PASCHOLATI, 1999). O aumento encontrado na cultivar Golden em 72 hs foi de 84% chegando à 336% em 168 hs (Figura 5A ; Tabela 4). Já a cultivar Sunrise Solo apresentou um aumento de 87% e 225% após 72 e 168 hs respectivamente (Figura 5B e Tabela 4). Roncato e Pascholate (1998) tiveram resultados semelhantes em folhas de sorgo tratadas com extrato autoclavado de *S. cerevisiae*, em que a atividade de peroxidase teve um aumento de 225, 250 e 350% após 24, 48 e 72 hs de tratamento. Entretanto, em plantas de milho testadas só houve aumento na atividade de peroxidase quando utilizadas suspensões de *S. cerevisiae* sem autoclavagem.

Mlicková et al (2004) também verificaram que mudas de tomate tiveram um aumento na atividade da peroxidase quando elicitadas com o fungo *Oidium neolycopersici*. Acréscimos na atividade da enzima peroxidase também foram encontrados em plantas de feijão tratadas com o fungo indutor *Colletotrichum lindemuthianum* (CAMPOS et al., 2004). Matsuyama e Kozaka (1981) também verificaram o aumento da atividade de peroxidase em arroz tratados com elicitor fúngico.

Desta forma, o aumento da atividade de peroxidase é uma resposta comum a plantas submetidas ao tratamento com elicitores fúngicos e as mudas de mamoeiro analisadas comportaram-se de forma semelhante.

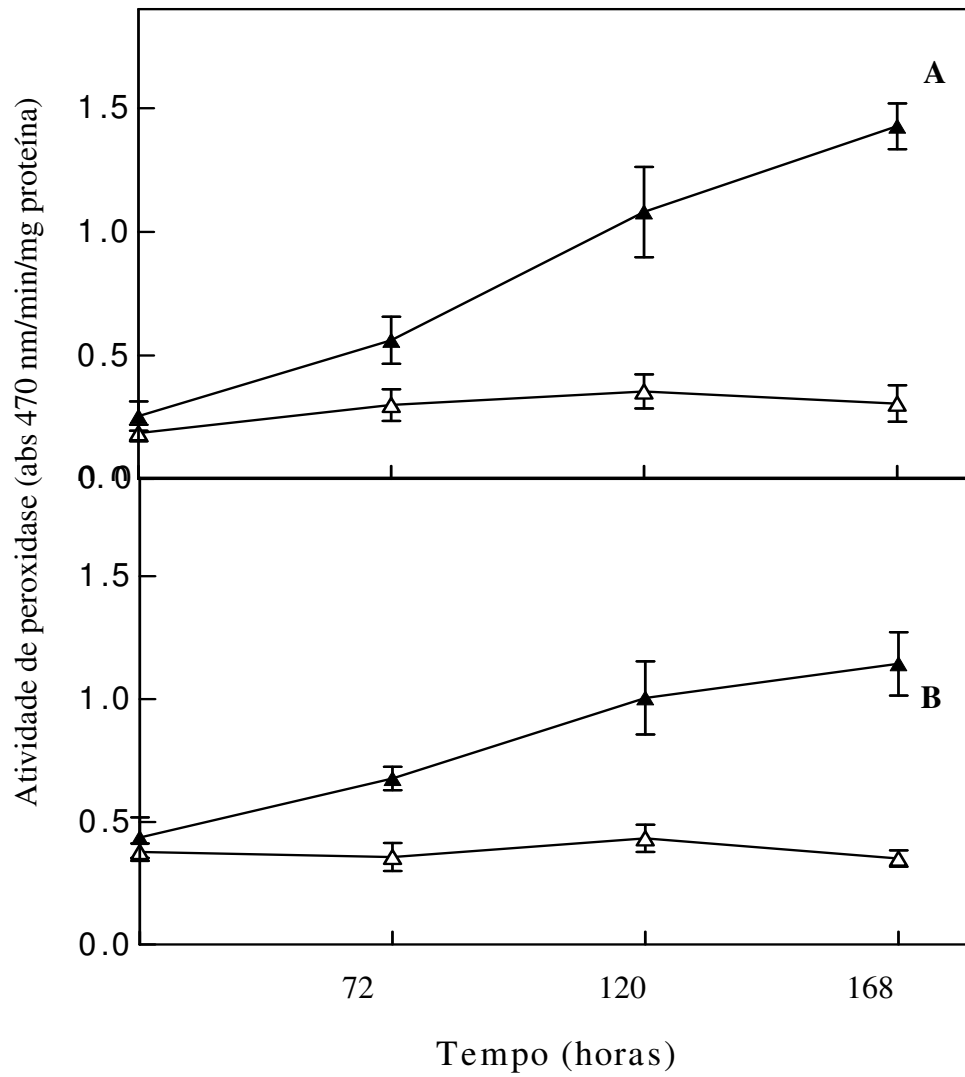


Figura 5 - Atividade de peroxidase em plantas das cultivares Golden (A) e Sunrise Solo (B) tratadas com extrato de levedura em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 hs). \triangle Atividade de peroxidase em mudas tratadas com água destilada; \blacktriangle Atividade de peroxidase em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras correspondem ao erro padrão

O tratamento com SNP causou aumento na atividade da enzima peroxidase após 72 horas nas duas cultivares avaliadas e foi semelhante ao resultado encontrado com o tratamento com extrato de levedura, em que o aumento na atividade enzimática foi diretamente proporcional ao tempo de exposição ao tratamento.

A atividade de peroxidase na cultivar Golden apresentou um aumento de 129% após 72 hs e de 219% 168 hs após o tratamento com SNP (Figura 6 ; Tabela 4). A cultivar Sunrise Solo teve um aumento de 131 e 203 % após 72 e 168 horas, respectivamente.

Resultados diferentes foram encontrados em fluidos intercelular de *Zinnia elegans* tratados com doadores de ON, onde houve a redução da atividade de peroxidase (BARCELÒ et al., 2002).

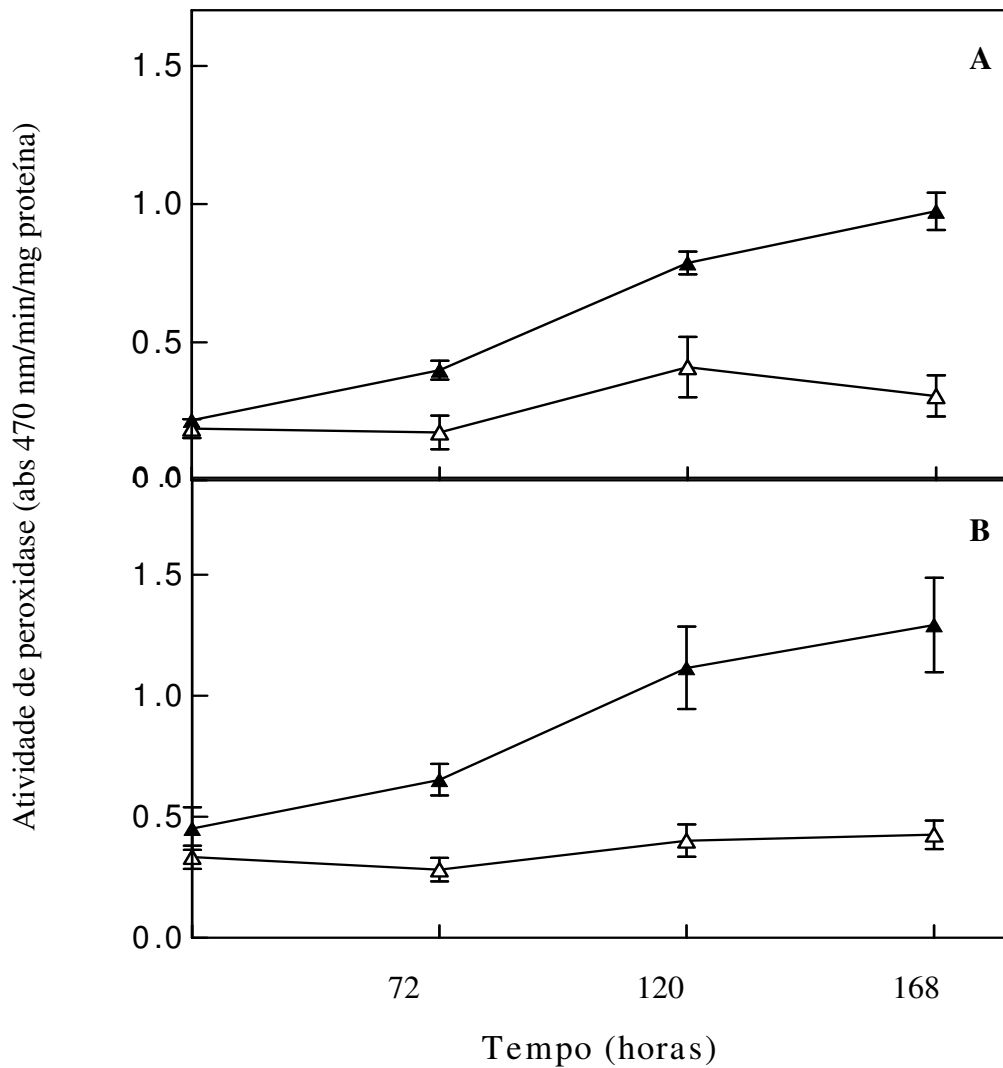


Figura 6-Atividade da peroxidase em plantas das cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com SNP em diferentes tempos de exposição (0, 72, 120 e 168 hs). \triangle Atividade de peroxidase em mudas tratadas com água destilada; \blacktriangle Atividade de peroxidase em mudas tratadas com SNP. As barras correspondem ao erro padrão.

As peroxidases estão relacionadas a formação de lignina, a oxidação de compostos fenólicos e na biossíntese do hormônio vegetal etileno que está ligado na sinalização das respostas de defesa (ASADA, 1992 ; STRACK, 1997).

O SNP mostrou-se mais eficaz no aumento da atividade enzimática em mudas tratadas após 72 horas, mostrando que este foi capaz de induzir mais rapidamente o aumento da atividade da enzima peroxidase (Figura 6A e 6B). O extrato de levedura ocasionou uma resposta mais lenta em 72 horas, entretanto causou um aumento superior ao encontrado nas mudas tratadas com SNP em 120 e 168 hs.

A cultivar Sunrise Solo foi eficiente nas respostas de defesa em curto prazo (72 hs) que a cultivar Golden, entretanto esta última apresentou uma maior atividade de peroxidase mais tardiamente (168 hs).

A atividade da enzima peroxidase pode estar relacionado a resistência de cultivares, sendo relatado que o aumento da sua atividade é maior em cultivares mais resistentes. Shimoni et al (1991) mostraram que a atividade da peroxidase aumentou mais rapidamente em cultivares de milho resistentes à infecção por *Exserohilum turcicum*, do que nos suscetíveis. Fauth et al (1996) verificaram que o fortalecimento da parede celular e a atividade de peroxidase tornou uma cultivar de pepino, a resistente à fungos. Entretanto, não podemos associar diretamente esta enzima à resistência. Dalisay e Kuc (1995 a, 1995 b) demonstraram que plantas de tomate transformadas, para expressão de uma peroxidase de pepino mesmo produzindo mais peroxidases, não ficaram mais resistentes a patógenos. Ray et al (1998) verificaram resultados semelhantes em plantas de algodão transformadas para expressão de uma peroxidase de pepino, onde obtiveram grande aumento na atividade das enzimas, entretanto não foi verificado aumento de resistência dessas plantas a patógenos (RAY et al., 1998).

Tabela 4- Atividade média de peroxidase nas cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com água (T1), SNP (T2) e extrato de levedura (T3)

Tempo (hs)	Tratamento	Atividade de peroxidase (abs/min/ g tecido fresco)	
		Golden	Sunrise Solo
0	T1	0.187 b ¹	0.335 b
	T2	0.217 b	0.317 b
	T3	0.255 b	0.346 b
72	T1	0.173 b	0.282 b
	T2	0.398 b	0.653 a
	T3	0.561 a	0.676 a
120	T1	0.410 b	0.401 b
	T2	0.786 a	1.166 a
	T3	1.08 a	1.005 a
168	T1	0.305 b	0.426 b
	T2	0.839 a	1.126 a
	T3	1.426 a	1.14 a

¹ Medidas seguidas com a mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

4.3 CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS

O acúmulo de carboidratos é uma característica geral de organismos como forma de proteção celular. Constitui-se em uma adaptação fisiológica das plantas frente ao ataque de patógeno ou substâncias químicas que agem como elicitores (KOCH, 1996). Os carboidratos também possuem função estrutural participando da formação de lignina junto aos compostos fenólicos (LEWIS; YAMAMOTO, 1990).

O tratamento com levedura foi capaz de induzir o aumento nos níveis de açúcares solúveis totais, sendo que após 24 hs foi observado um aumento na sua concentração em mudas das duas cultivares (Figura 7A e 7A; pág. ; Tabela 5). As mudas do cultivar Golden apresentaram um aumento de 46 % nos valores de açúcares solúveis totais após 24 hs do tratamento com extrato de levedura, entretanto, em 48 horas não houve diferença significativa (Figura 7A; Tabela 5). Já as mudas do cultivar Sunrise Solo apresentaram um aumento de 24 % após o mesmo período quando comparado ao controle, não havendo diferença significativa após 48 hs (Figura 7A; Tabela 5). Wulff e Pascholati (1998) observaram resultados semelhantes em plantas de sorgo tratadas com extrato de *S. cerevisiae*.

As concentrações de carboidratos redutores (glicose e frutose) não apresentaram variação em nenhuma das cultivares de mamoeiro tratadas com o extrato de levedura (Figura 7B e 7B).

As concentrações de sacarose em mudas de Golden e Sunrise Solo tratadas com extrato de levedura tiveram os níveis aumentados em 65 e 72 % após 24 hs do tratamento, respectivamente. Após 48 hs este aumento foi de 39% e 35%, respectivamente (Figura 7C e 7C ; Tabela 5). A sacarose é o açúcar translocado nas plantas e o seu aumento pode estar relacionado a resposta de defesa.

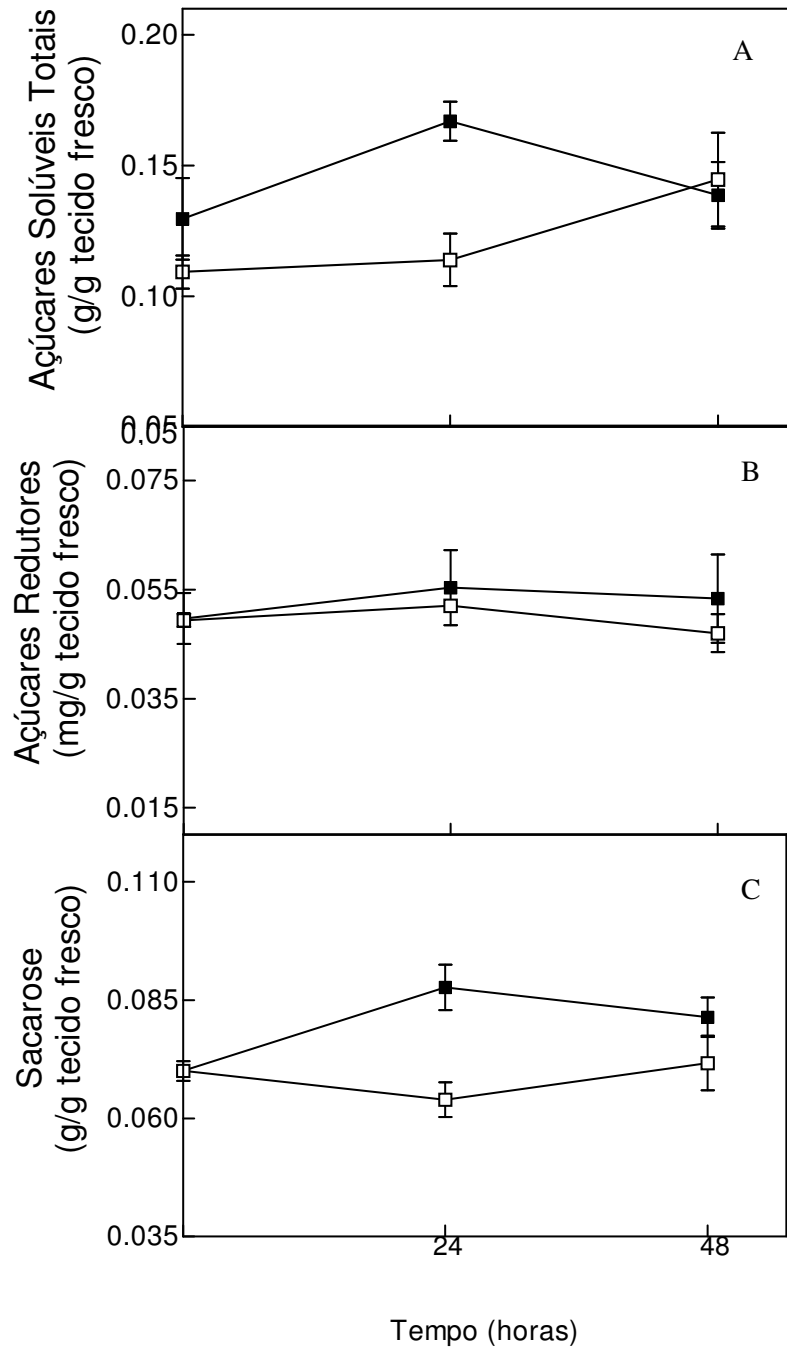


Figura 7 - Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Golden tratadas com extrato de levedura; □ Carbohidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; ■ Carbohidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras correspondem ao erro padrão

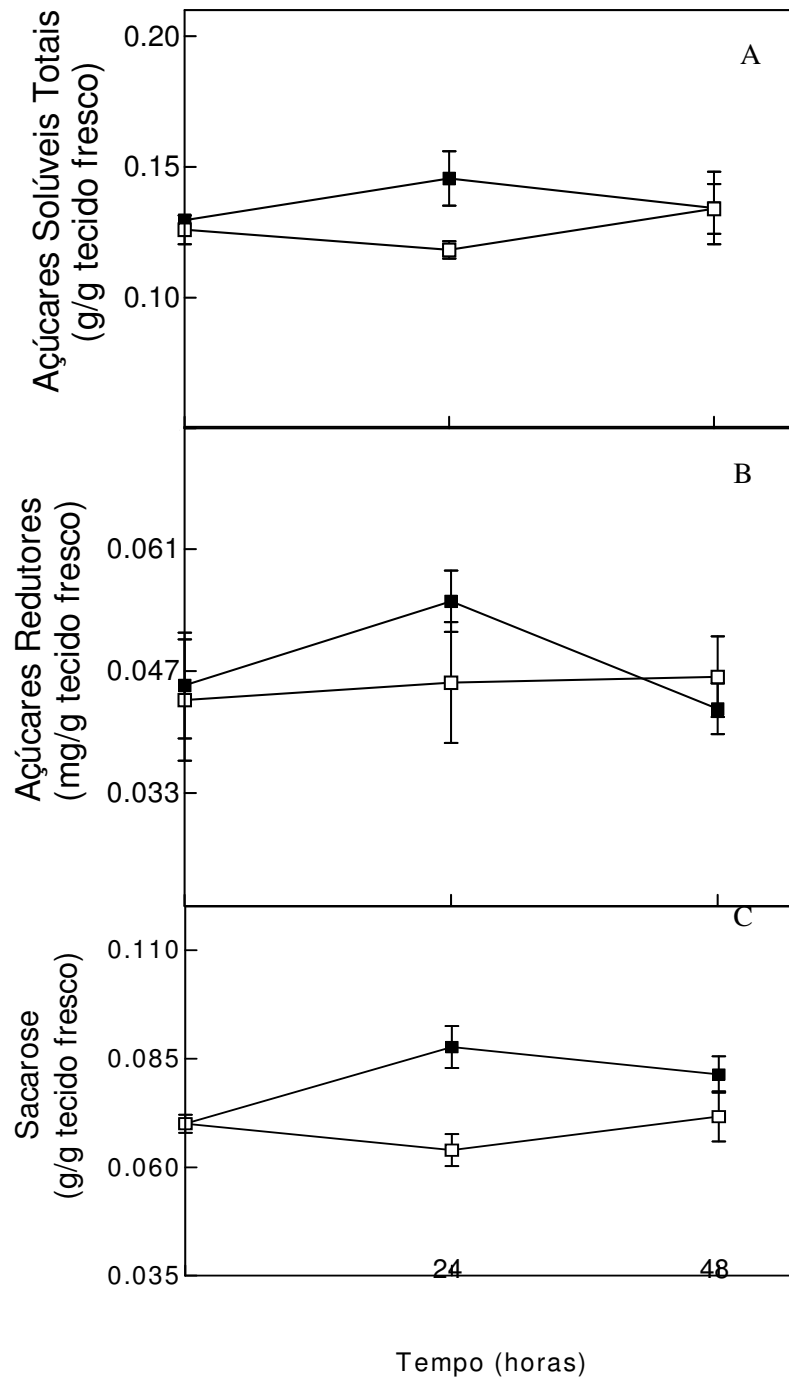


Figura 8 - Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Sunrise Solo tratadas com extrato de levedura; \square Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; \blacksquare Carboidratos totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com extrato de levedura. As barras correspondem ao erro padrão

A concentração de açúcares solúveis totais variou com o tratamento de SNP em ambas cultivares (Figura 7A e 8A). A concentração de açúcares solúveis totais na cultivar Golden em 24 hs após o tratamento foi 28%, já em 48 hs não houve diferença estatística quando comparado ao controle (Figura 9A; Tabela 5). Na cultivar Sunrise Solo este aumento foi de 32% após 24 hs, não havendo diferença estatística em 48 hs após o tratamento (Figura 9A; Tabela 5).

Apesar, dos açúcares redutores serem um dos compostos que mais se acumularam mediante a indução de gene de resistência em folhas de fumo (HERBERS et al, 1996), seus níveis não variaram em mudas de mamoeiro cv. Golden tratadas com SNP (Figura 7B; Tabela 5). A concentração de açúcares redutores na cultivar Sunrise Solo também não se diferenciou estatisticamente do controle quando tratado com SNP (Figura 8B; Tabela 5).

A cultivar Golden apresentou em 24 e 48 horas, um aumento na concentração de sacarose de 47% e 34% respectivamente (Figura 9C). Já na Sunrise Solo estes valores foram de 77% e 60% (Figura 9 C).

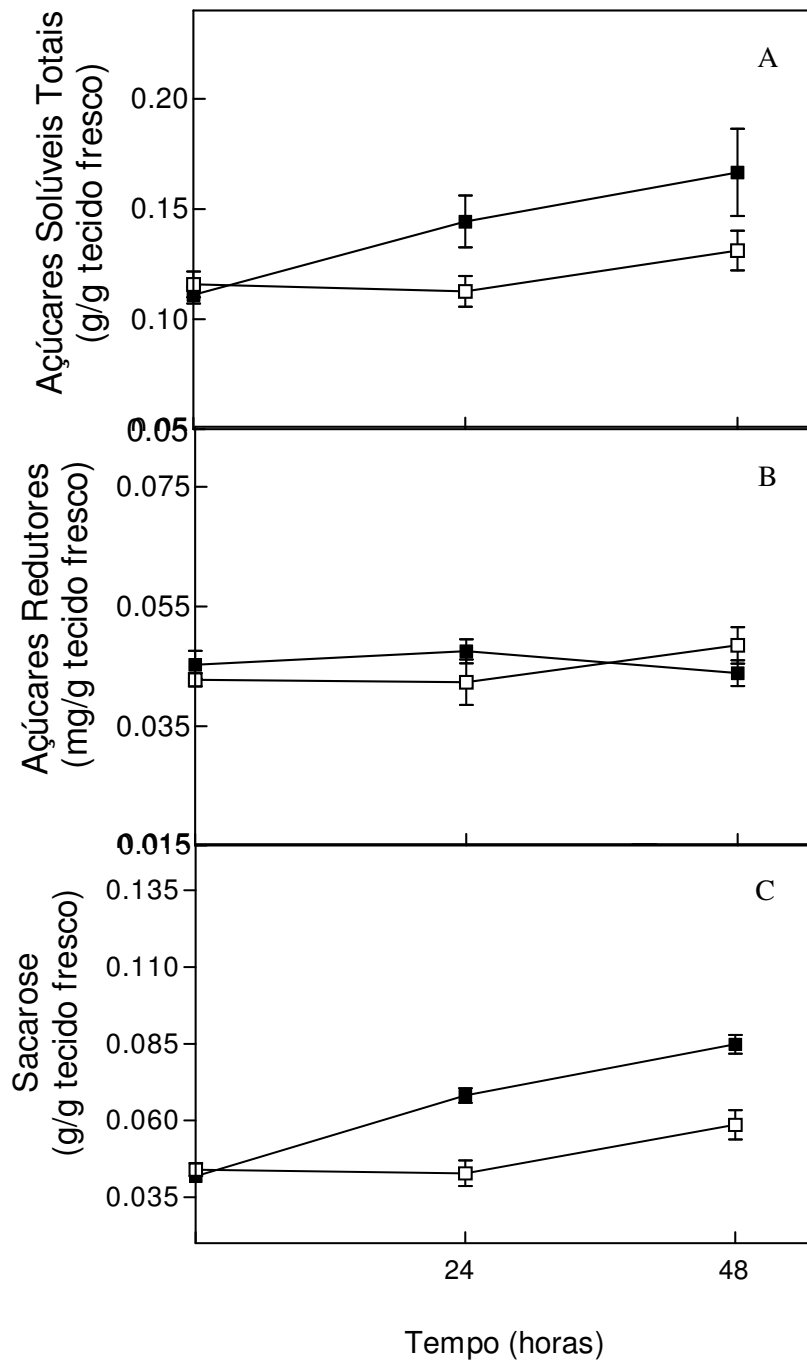


Figura 9- Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Golden tratadas com SNP; □ Carboidratos solúveis totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; ■ Carboidratos solúveis totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com SNP. As barras correspondem ao erro padrão

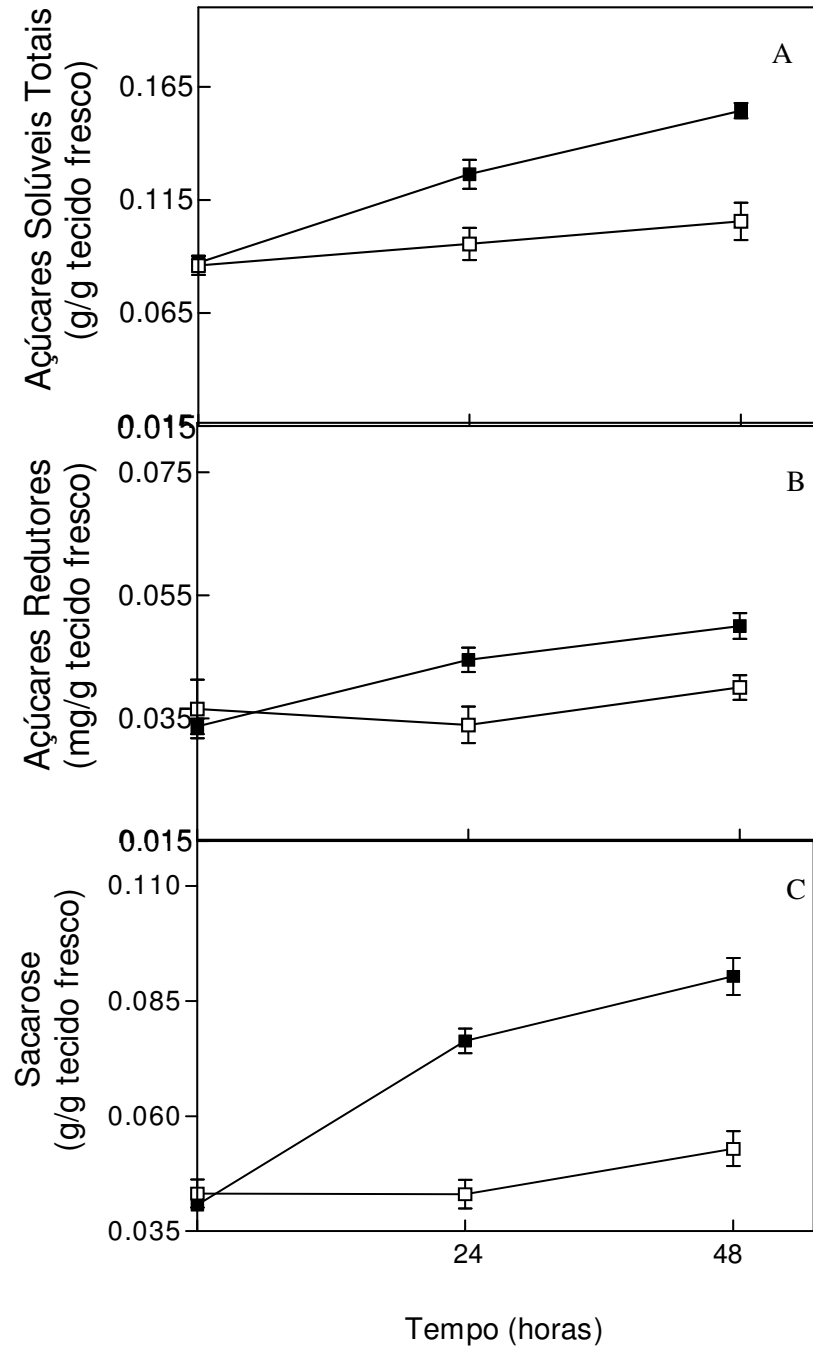


Figura 10- Concentração de carboidratos totais (A), frutose (B) e sacarose (C) em plantas da cultivar Sunrise Solo com SNP; \square Carboidratos solúveis totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com água; \blacksquare Carboidratos solúveis totais, frutose, sacarose em mudas tratadas com SNP. As barras correspondem ao erro padrão

O tratamento com SNP causou maior aumento de açúcares solúveis totais, tanto 24 quanto 48 hs após os tratamentos. A concentração de açúcares redutores não variou em nenhuma das cultivares, entretanto houve um aumento na concentração de sacarose 24 e 48 horas após o tratamento, sendo que na cultivar Sunrise houve um aumento bem superior ao encontrado com o tratamento com extrato de levedura.

A cultivar Sunrise Solo foi a que teve maior acúmulo de açúcares solúveis totais, com variação em 24 horas após o tratamento com extrato de levedura e 24 e 48 horas quando tratadas com SNP. A concentração de sacarose foi bem maior em mudas da cultivar Sunrise Solo que a encontrada nas mudas da cultivar Golden tratadas com SNP. Estes resultados mostram que a cultivar Sunrise Solo foi mais eficiente no acúmulo de açúcares após os tratamentos quando comparado a cultivar Golden.

O aumento nos níveis de açúcares solúveis totais, além de ter sido relacionado a indução de resistência em algumas plantas (HALL; LOOMIS, 1972; HORSFALL; DIMOND, 1957; WATSON; WATSON, 1951), também induziu a expressão de proteínas relacionadas à resposta de defesa (SALZMAN et al., 1998; HEBERTS et al., 1994; JONHSON ; RYAN, 1990).

Tabela 5- Concentrações médias de carboidratos solúveis totais, frutose e sacarose nas cultivares Golden e Sunrise Solo tratadas com água (T1), SNP (T2) e extrato de levedura (T3)

Tempo (hs)	Tratamento	Açúcares Solúveis Totais (g/ g tecido fresco)		Açúcares Redutores (mg/ g tecido fresco)		Sacarose (g/ g tecido fresco)	
		Golden	Sunrise Solo	Golden	Sunrise Solo	Golden	Sunrise Solo
0	T1	0.115 a ¹	0.086 b	0.042 a	0.083 a	0.044 a	0.0418 a
	T2	0.109 a	0.0872 b	0.044 a	0.073 a	0.018 a	0.0418 a
	T3	0.107 a	0.120 a	0.045 a	0.045 a	0.044 a	0.044 a
24	T1	0.112 c	0.095 b	0.045 a	0.033 b	0.046 c	0.0462 c
	T2	0.144 ab	0.126 a	0.045 a	0.044 ab	0.068 b	0.0682 b
	T3	0.167 a	0.145 a	0.055 a	0.055 ab	0.087 a	0.0852 a
48	T1	0.131 a	0.105 b	0.046 a	0.040 ab	0.056 b	0.0625 c
	T2	0.166 a	0.125 ab	0.046 a	0.050 a	0.071 a	0.084 a
	T3	0.138 a	0.124 ab	0.042 a	0.042 ab	0.081 a	0.081 ab

¹ Medidas seguidas com a mesma letra , na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade

4.4 EXPRESSÃO GÊNICA

As mudas tratadas com extrato de levedura mostraram um aumento da expressão do gene responsável pela produção da peroxidase ligada a produção de lignina, após 4 e 8 hs do tratamento (Figura 11 B). Resultados semelhantes foram encontrados por Matsuyama e Kosaka (1981) onde foi verificado o aumento da expressão do gene responsável pela produção da enzima peroxidase em arroz tratado com elicitor fúngico. Sasaki et al (2004) observaram o aumento na expressão de 12 diferentes genes de peroxidases em arroz infectados por fungo.

O SNP causou resultados semelhantes ao tratamento com extrato de levedura, induzindo a expressão do gene de peroxidase após 8 horas do tratamento (Figura 11B). Trabalhos recentes revelam que o tratamento de plantas com SNP causou aumento na expressão de diversos genes de defesa como os genes responsáveis pela produção das enzimas FAL e chalcona sintase, duas importantes enzimas da via dos fenilpropanóides, que são precursores de lignina.

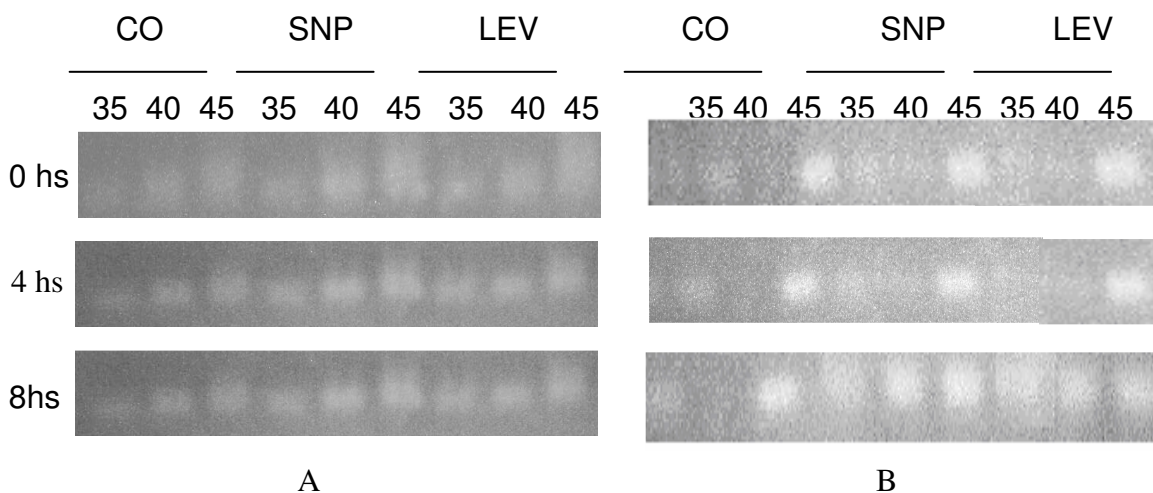


Figura 11 – Expressão gênica em *Carica papaya*, cultivar Golden. CO- Mudas tratadas com água destilada; SNP- mudas tratadas com SNP; LEV- Mudas tratadas com extrato de levedura. A- gene da proteína actina; B- gene da proteína peroxidase. 1- Expressão gênica 0 hs; 2 Expressão gênica após 4 hs de tratamento; 3- expressão gênica após 8 hs de tratamento.

O tratamento com extrato de levedura assim como o tratamento com SNP não alteraram a expressão gênica do gene *npr1* (Figura 12).

Horvath et al (1996) relatam que obtiveram um aumento na expressão do gene *npr1* 12 e 16 horas após a elicitação e que foi observado também, picos de expressão 2 e 3 horas após o tratamento com ácido salicílico. Portanto, o tempo de expressão analisado pode não ter sido suficiente para observar a expressão do gene *npr1*. Além disto, há relatos no qual o tratamento com doadores de ON causariam o decréscimo de ácido salicílico e como a expressão do gene NPR1 é dependente da produção de ácido salicílico, o seu decréscimo acarretaria na falta de aumento na expressão gênica deste gene.

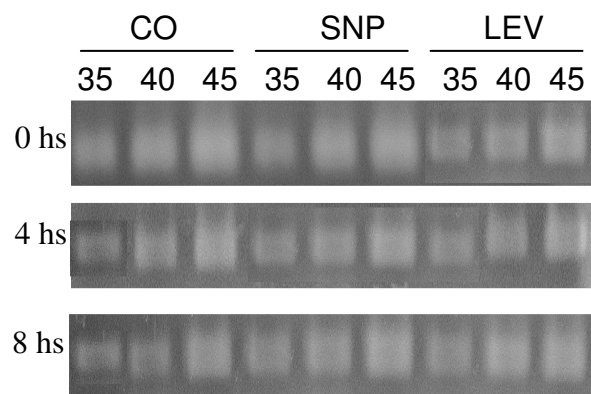


Figura 12 – Expressão do gene *npr1* em *Carica papaya*, cultivar Golden. CO- Mudas tratadas com água destilada; SNP- mudas tratadas com SNP; LEV- Mudas tratadas com extrato de levedura. 1- Expressão gênica 0 hs; 2 Expressão gênica após 4 hs de tratamento; 3- expressão gênica após 8 hs de tratamento.

O tratamento com extrato de levedura e SNP não alteraram a expressão da enzima SOD-MN (Figura 13) apesar de haver a indução prévia de genes ligados a produção de enzimas antioxidantes que protegem as células da planta do estresse oxidativo (UQUILLAS et al., 2004). O aumento na expressão desta enzima antioxidativa talvez fosse observado se a análise fosse feita com a enzima SOD-Cu/Zn que está relacionada diretamente as explosões oxidativas no citoplasma, local característico das principais respostas de defesa.

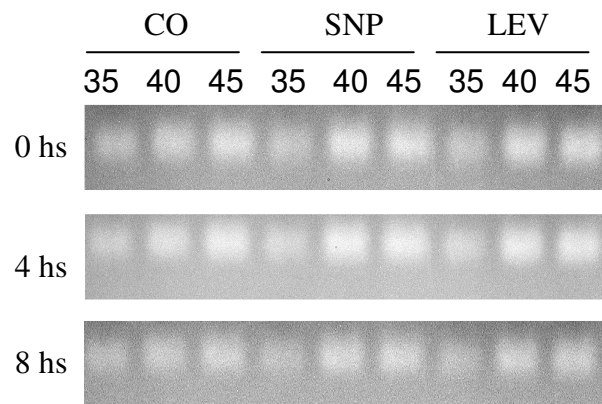


Figura 13 – Expressão gênica da proteína SOD-MN em *Carica papaya*, cultivar Golden. CO- Mudas tratadas com água destilada; SNP- mudas tratadas com SNP; LEV- Mudas tratadas com extrato de levedura. 1- Expressão gênica 0 hs; 2 Expressão gênica após 4 hs de tratamento; 3- expressão gênica após 8 hs de tratamento.

5 CONCLUSÕES

O extrato da levedura *Saccharomyces cerevisiae* assim como o nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico apresentaram atividade elicitora, sendo capazes de induzir respostas associadas a defesa em mudas de mamoeiro do grupo Solo, cvs Golden e Sunrise Solo, do grupo Solo:

1- As concentrações de compostos fenólicos foram maiores em mudas de mamoeiro tratadas com o extrato de levedura e o nitroprussiato de sódio (SNP);

2- Houve aumento significativo da atividade de peroxidase em mudas tratadas com ambos elicitores;

3- Foi observado um aumento na concentração de açúcares, principalmente sacarose, em mudas tratadas com SNP.

4- Os resultados com extrato de levedura e SNP causaram um aumento na expressão do gene responsável pela produção da peroxidase após 4 e 8 hs. O gene npr1 e o gene responsável pela produção da proteína SOD-Mn não tiveram sua expressão alterada.

As conclusões são resumidas na tabela 6.

Tabela 6. Resumo dos resultados obtidos

Cultivares	F. Liv.		F. Lig		POX		C.S.T		Fru		Sac	
	Lev	ON	Lev	ON	Lev	ON	Lev	ON	Lev	ON	Lev	ON
Golden	+	++	++	0	++	+	+	++	0	0	+	++
Sunrise	+	+	++	+	++	+	++	+	0	0	+	++

F. Liv- fenóis livres; F. Lig- fenóis ligados; C.S.T.- carboidratos solúveis totais; FRu- frutose; Sac-sacarose. + induziu, ++ induziu mais intensamente; 0- não houve diferença

6. PERSPECTIVAS

Estudos futuros deverão avaliar o tempo que dura as respostas de defesa em mudas de mamoeiro cv. Golden e Sunrise Solo e se os indutores testados (ON e extrato de levedura) são capazes de induzirem uma resposta sistêmica. São necessários também, pesquisas testes com o extrato de levedura e o SNP para avaliar seus efeitos como indutores de resistência, ou seja, se estes elicitores são capazes de tornar as mudas resistentes à infecção por patógenos.

7. REFERÊNCIAS

ABELLES, F.B.; BILES, C.L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v.95, p.269-273, 1991.

ALVES, F. de L. A cultura do mamão *Carica papaya* no mundo, no Brasil e no estado do Espírito Santo. In Martins, D. dos S.; Costa, A. de F. S. da. (Org). **A cultura do mamoeiro**: Tecnologias de produção. Vitória, ES: Incaper, 2003. p.497

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. **Physiological Plantarum**, v.85, p. 235-241, 1992.

ANDREU, A.; TONÓN, C.; VAN DAMME, M.; HUARTE, M.; DALEO, G.; Effect of glucans from differnt races of *Phytophthora infestans* on defense reactions in potato tuber. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p. 777-783, 1998.

ANWAR, M.N.; MAJUMDER, S.K.; SHETTY, H.S. Changes in phenolic acids in sorghum and maize leaves infected with *Peronosclerospora sorghi*. **Indian Phytopathology**, v.48, n.1, p. 21-26, 1995.

APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F& LOW, P.S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of culture plant cells. **Plant Physiology**, v.90.p.109-116, 1989.

BAKER,C.J. & ORLAND,E.W. Active oxygen and pathogenesis in plants. In Stacey, G. & Keen, N.T. (Org). **Plant Microbe Interations**. 3. ed. St. Paul, Minnesota: APD Press, 1999. cap 3. p.81-119.

BASSE, C.; BOCK, K.; BOLLER, T. Elicitors and supressors of the defense response in tomato cells: purification and characterization of glycopeptide elicitors and glycan supressors generates by enzymatic cleavage of yeast invertase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.15 p. 28-32, 1992.

BARCELÓ, A.R.; POMAR, F.; FERRER, M.A.; MARTINEZ, P.; BALLESTRA, M.C.; PEDREÑO, M.A. In situ characterization of NO-sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. **Physiologia Plantarum**, v.114, p.33-40, 2002.

BARZ, W.; KOSTER, J. Turn over and degradation of secondary (natural) products. In: Con,E.E.; STUMPF, P.K. (Org.). **The biochemistry of plants: a comprehensive tretise**. New York: Academic Press, 1981. p.457-479.

BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cell: keys to programmed cell death and priderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, p.101-110, 2000.

BENHAMOU, N.; GARAND, C. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Fo47. **Phytopathology**, v.91, n.8, p.730-740, 2001.

BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P.J. Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. **Planta**, v.197, p. 89-102, 1995.

BOLLER, T. Ethylene and plant-pathogen interaction. **Curr. Top. Plant Physiology**, v.5, p. 138-145, 1990.

BOLWELL, G.P. Role of active oxygen species and NO in plant defense. **Curr. Opinion Plant Biology**, v.2, p.287-294, 1999.

BOSTOCK, R. M. Signal conflicts and synergies in induce resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.99-109, 1999.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v.103, p. 1035-1040, 1993.

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

CAMERON, R. K. Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, p. 91-93, 2000.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSORIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CAO, H.; BOWLING, S.A.; GORDON, S.; DONG, X. Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v.6, p.1583-1592, 1994.

CAO, H.; DONG, X. Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.653-656, 1998.

CERVONE, F. HAHN, M. G.; DE LORENZO, G.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions: XXX III. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant disease responses. **Plant Physiology**, v.90, p. 542-548, 1989.

CLARK, D.; DURNE, J.; NAVARRE, D.A.; KLESSING, D.F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Molecular Plant Microbe Interact**, v.13, p.1380-1384, 2000.

CLARKE, A.; DESIKAN, R.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in arabidopsis thaliana suspensions cultures. **Plant Journal**, v.24, p.667-677, 2000.

COSTA, A. de F. S. da.; PACOVA, B.E.V. Caracterização de cultivares, estratégias e perspectivas do melhoramento genético do mamoeiro. In Martins, D. dos S.; Costa, A. de F. S. da. (Org). **A cultura do mamoeiro**: Tecnologias de produção. Vitória, ES: Incaper, 2003. p.497

COSTET, L.; THULKE, O.; SCHWINDLING, S.; KOHLER, A. Priming as a mechanism in induced systemic resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p. 113-119, 2001.

DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, n.5, p.315-327, 1995 a.

DALISAY, R. F.; KUC, J. A. Persistence of reduced penetration by *Colletotrichum lagenarium* into cucumber leaves with induced systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47 n.5, p.329-338, 1995 b.

DANGL, J. Plants just say NO to pathogens. **Nature**, v.394, p. 525-526, 1998.

DAT, J.; VANDENBEELE, VRANOVA, E.; VAN MOUYTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGM, F.; Dual action of the oxygen species during plant stress responses. **Cell Molecular Life Sci**, v.57, p.779-795, 2000.

DAVIS, D.A.; LOW, P.S. HEINSTEIN, P. Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.52, p. 259-273, 1998.

DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Nature**, v. 394, p. 585-588, 1998.

DELLEDONE, M.; XIA, Y, DIXON, R.A.; LAMB, C.; Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p. 585-588, 1998.

DESPRÉS, C.; DELONG, C.; GLAZE, S.; LUI, E.; FOBERT, PR. The Arabidopsis NPR1/Nim 1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. **Plant Cell**, v.12, p.279-290, 2000.

DIXON, R.A., HARRISON, M.J & LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense response. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p 479-501, 1994.

DODDS, J. A.; BAR-JOSEPH, M. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. **Phytopathology**, v. 73, p. 419-423, 1983.

DUBERY, i.a.; SLATER, V. Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. **Phytochemistry**, v.44, n.8, 1996.

DURNER, J.; KLESSING, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr. Opin. Plant Biol**, v.2, p.369-374, 1999.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSING. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends plant Sci**, v.2, p.266-274, 1997.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSING, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.95, p. 10328-10333, 1998.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Rev. Phytopathol**, v.42, p.185-209, 2004.

EATON, F. ; RIGLER, N. Influence of carbohydrate level and root-surface microfloras on *Phymatotrichum* root rot in cotton and mize plants. **J. Agric. Res**, v. 72, p. 137-161, 1946.

FAUTH, M. MERTEN, A.; HAHN, M.G.; JEBLICK, W.; KAUSS, H. Competence for elicitation of H₂O₂ in hypocotyls of cucumber is induce by breaching the cuticle ans is enhanced by salicylic acid. **Plant Physiology**, v.110, n2, p.347-354, 1996.

FOISSNER, I.; WENDEHENNE, D.; LANGEBARTELS, C.; DURNER, J. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. **Plant Journal**, v.23, p.817-824, 2000.

FOYER, C.H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J.F.; SCOTT, I.M. Hydrogen peroxidase and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiological Plant**, v.100, p.241-254, 1997.

FRIEND, J. Plant phenolics, lignification and plant disease. **Progress in Phytochemistry**, v.7, p.197-261, 1981.

FRY, S.C. Croos-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Pathology**, v.37, p.165-186, 1986.

GODARD, J.F.; ZIADI, S.; MONOT, C.; LE CORRE, D.; SILUÉ, D. Benzothiadizole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. **Crop Protection**, v.18, n.6, p. 397-405, 1999.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BENCKHOVE, U.; KOGEL, K.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J.; Benzothiadizole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v.8, p. 629, 1996.

GUAN, L.M.; ZHAO, J.; SCANDALIOS, J.G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize Cat 1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. **Plant Journal**, v.22, p.87-95, 2000.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R.; KIDA, K.; MARTINS, E.M.F.; ROVERATTI, D.S. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloreto de benzalcônico (composto de amônio quaternário). **Summa Phytopatologica**, v.25, p. 339-345, 1999.

GREENBERG, T. G. Programmed cell death: a way of life for plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.93, p.12094-12097, 1996.

GRISEBACH, H. Lignins. In: CON, E.E.; STUMPF, P.K. (Org.). **The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1981.v.7, cap.15, p.457-479.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced resistance: how do induce plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.77-84, 1999.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p. 387-412, 1996.

HAHN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host-Pathogen interaction – XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant physiology**, v.62, p. 107-111, 1978.

HEATH, M.C. Thoughts on the role and evolution of induced resistance in natural ecosystems and its relationship to other types of plant defense. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Org.) **Induced resistance to disease in plants**. New York: Kluwer Academic, 1995. p. 141-151.

HEATH, M.C. Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.58, p. 53-54, 2001.

HERBERS, K.; MONKE, G.; BADUR, R.; SONNEWALD, U. A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: Isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol**, v.29, p. 1027-1038.

HOAGLAND, R.E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E. (Org.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 87-113.

HRAZDINA, G. Compartmentation in phenolic metabolism. **Acta Horticulturae**, v.1, n.381, p. 86-93, 1994.

HOLBERT, J.; HOPPE, P.; SMITH, A. Some factors affecting infection with and spread of *Diplodia* in host tissue. **Phytopathology**, v. 25, p. 1113- 1114, 1935.

HORSFALL, J. The story of nonconformist. **Annu rev. Ohytopathol**, v. 13, p. 1-13, 1975.

HUANG, J.S.; KNOPP, J.A. Involvement of nitric oxide in *Rastonia solanacerum* – induce hypersensitive reaction in tobacco. In: Prior, P.H., Allen, C., Elphinstone, J.G, (Org.). **Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects**. Springer-Verlag, Berlin, 1998, p.218-224.

HUANG, Q.; KUC, J. Cutin, cutinase and esterase as related to the induced systemic resistance of cucumber against *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, n3, p.215-226, 1995.

HUANG, X.; VON RAD, U.; DURNER, J. Nitric oxide induces transcription activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. **Planta**, v.215, p.914-923, 2002.

HRAZDINA, G. Compartmentation in phenolic metabolism. **Acta Horticulture**, v.1, n.381, p.86-93, 1994.

HRAZDINA, G.; BOREJSZA-WYSOCKI, W. LESTER, C. Phytoalexin production in an apple cultivar resistant to *venturia inaequalis*. **Phytopathology**, v.87, n.8, p. 868-876, 1997.

HUTCHESON, S. W. Current concepts of active defense in plant. **Annual Review of phytopathology**, v.36, p.59-90, 1998.

ISAAC, S. In: ISAAC, S. (Org.). **Fungal and plant interactions**. Cambridge: Chapman and Hall, 1992. v.7, cap3, p.418.

ISHII, H.; TOMITA, Y.; HORIO, T.; NARUSSAKA, Y.; NASKASAWA, Y.; NISHIMURA, K.; IWAMOTO, S.; Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.77-85, 1999.

JHNSON, R.; RYAN, C.A. Wound-induced potato inhibitor II genes: Enhancement of expression by sucrose. **Plant Mol. Biol**, v.14, p. 527-536.

KAMIDA, H. M.; PASCHOLATI, S.; BELLATO, C. M. Influencia de *Saccharomyces cerevisiae* na expressão gênica da fenilalanina amônia-liase em tecido de sorgo

protegido contra *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.1, p.74-77, 2000.

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, n.8, p. 720-727, 1999.

KOCH, W. WAGNER, C.; SEITZ, U. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. **Planta**, v.206, p.523-532, 1998.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A. Influence of wheat streak mosaic vírus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.47, p.365-377, 1995.

KOFALVI, S. A.; NASSUTH, A . A influence of wheat stresk mosaic vírus infection on phenilpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. **Phytopathological Society of Japan**, v.64, p.80-84, 1998.

KUC, J. Induced systemic resistance- an overview. IN: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Org.). **Induced resistance to disease in plants**. New York: Kluwer Academic, 1995. p. 169-175.

LAMB, C.; DIXON, R.A. Mechanisms of plant disease resistance. Signal Payhways fro the activation of defense responses. Revista Brasileira de Fitopatologia, Palestras do XXX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1997.

LANGEBARTELS, C.; SCHRAUDNER, M.; HELLER, W.; ERNST, D.; SANDERMANN. Oxidative stress and defence reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In: D.Inze, M.; Van Moutagu (Org.). **Oxidative Stress in Plants**. Amstredam: Harwood Academic Publishers, 2000. p.105-135.

LAWRENCE, C.B.; JOOSTEN, M.H.A.; TUZUN, S. Diferential induction of pathogenesis related protein in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiol. Mol.Plant Pathol**, v.48, p.361-377, 1996.

LEBEDA, A. LUHOVÁ, L.; SEDLÁROVÁ, M.; JANCOVÁ, D.; The role of enzymes in plant-fungal pathogens interaction. **Journal Plant Disease Protect**, v.108, p. 89-111, 2001.

LEITE, B. RONCATTO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F. LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p. 235-280, 1997.

LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annual Rev Plant Physiology Mol Biol, v.41, p.455-496, 1990.

LOW, S.P.; SCHROEDER, A.T. Signal transduction pathways of the oxidative burst. In: STACEY, G.; KEEN, N. (Org.). **Plant-microbe interactions**. New York: Chapman & Hall, 1997. cap.3, p.53-75.

LOWRY O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p. 265-275, 1951.

MACKERNESS, S.A.H.; JONH, C.F.; JORDAN, B.; THOMAS, B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide, **FEBS Lett**, v.489, p.237-242, 2001.

MARINS et al. **Recomendações para a cultura do mamoeiro dos grupos Solo e Formosa no ES**. Cruz das Almas: EMCAPA, 1995. cap. 2, p. 7, p.31.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, v.147, p.28-32, 1999.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to plant pathogen attack. **Annals of Botany**, v.82, p. 535-540, 1998.

MATSUYAMA, N.; KOZAKA, T. Increase of peroxidase activity unrelated with resistance to rice blast disease. **Ann. Phytopathol. Soc. Japan**, v.47, p.654-661, 1981.

McCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.; SILVEIRA, V. OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Annual of Chemistry**, v.22, p.1156-1158, 1950.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of plant Pathology**, v.107, n.1, p.13-18, 2001.

MILLAR, T.M.; STEVENS, C.R.; BLAKE, D.R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. **Biochem. Soc. Trans**, v.25, p.528, 1997.

MLICKOVÁ, K.; LUHOVÁ, L.; LEBEDA, A.; MIESLEROVÁ, B.; PEC, P. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.12, p.1-9, 2004.

MODOLO, L. V.; CUNHA, F. Q.; BRAGA, M. R.; SALGADO, I. Nitric Oxide Synthase-Mediated Phytoalexin Accumulation in Soybean Cotyledons in Response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. Meridionalis Elicitor. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1288-1297, 2002.

MOLLER, I. M.; Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p.561-591, 2001.

MORAES, M.G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p.261-284, 1998.

MOU, Z.; FAN, W.; DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. **Cell**, v.113, p. 935-944, 2003.

MURPHY, J.F.; GILLILAND, A.; WONG, C.E.; WEST, J.; SINGH, P.; CARR, J.P. Signal transduction in resistance to plant viruses. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p. 121-128, 2001.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; CLARKJE, A.; HANCOCK, J.T. H₂O₂ signalling in plant cells, in: C.Clavert, m. Smalwwod, DS. Bowles (Org.). **Plant responses to enviromental stress**, BIOS Scientific Publishers, Oxford, 1999, p.59-63.

NEUENSCHWABDER, U.; FRIEDRICH, L.; DELANEY, T.; VERNOOIJ, B.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Activation of plant disease resistance. **Aspects of Applied Biology**, v.42, p.217-225, 1995.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Anual Review of Phytopathology**, v.30, p.369-389, 1992.

NORITAKE, T.; KAWAKITA, K.; DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant Cell Physiology**. V.37, p. 113-116, 1996.

OLIVEIRA, A.M.G. et al. **Mamão para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília: EMBRAPA, 1994, v.2. cap. 3, p. 9-12, p.38-39.

OLIVEIRA, R.F. **Estudo do sistema de defesa constitutivo e induzido de *Mimosa scabrella* contra fungos**. 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

OLIVER, R.P.; IPCHO, S. V. S. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs. biotrophs classification of fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v.5, n.4, p.347-352, 2004.

OROZCO-CÁRDENAS, M.L.; RYAN, C. Nitric Oxide Negatively Modulates Wound Signaling in Tomato Plants. **Plant Physiology**, v.130, p.487-493, 2002.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123 f. Tese (Livre Docência). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L. (Org.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, v.1, cap.22. p.417-453.

PEDROSO, M. C.; MAGALHÃES, J. R.; DURZAN, D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cell. **Plant Sci**, v.157, p. 173-180, 2000 a.

PINTO, M. de; TOMMASI, F.; DEGARA, L. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. **Plant Physiology**, v.130, p. 698-708, 2002.

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

REPKA, V.; FISCHEROVÁ, I.; SILHAROVÁ, K. Biological activity of the elicitor released from mycelium of a gravine isolate of the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. **Vitis**, v.40, n.4, p. 205-212, 2001.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p. 123-129, 2003.

RICCI, P.; PANABIERES, F.; BONNET, P.; MAIA, N.; PONCHET, M.; DEVERGNE, J.C.; MARAIS, A.; CARDIN, L.; MILAT, M. L.; BLEIN, J.P. Proteinaceous elicitors of plant defense responses. Oligosaccharide elicitors: structure and recognition. In: International conference of European foundation for Plant Pathology. Strasbourg, 1993. **Proceedings. Dordrecht: Kluwer Academic**, 1993, p.121-135.

RICCI, P. Induction of the hypersensitive response and systemic acquired resistance by fungal proteins: the case of elicitors. In: STACEY, G.; KEEN, N.(Org.). **Plant-microbe interaction**. New York: Chapman & Hall, 1997. cap.3, p.53-76.

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 Agrícola**, v.55, n.3, p. 395-402, 1998.

SALZMAN, R.A.; TIKHONOVA, I.; BORDELON, B.P.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. **Plant Physiol**, v.117, p.465-472, 1998.

SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISSNER, H.J. Na elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. Physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.46, p. 293-307, 1995.

SCWEIZER, P.; KMECL, A.; CARPITA, N.; DUDLER, R.; A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* is recognized by a broad range of cereals. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, n.4, p. 157-167, 2000.

SHAH, J.; TSUI, F.; KLESSING, D.F. Characterization of salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana* identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. **Molecular Plant Microbe Interact**, v.10, p.69-78, 1997.

SHIMONI, M.; BAR-ZRU.; REUVENI, R. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Journal Phthtopathology**, v.131, p.315-321, 1991.

SILVA, D.N. da.; GOMES, J.A. A fruticultura no estado do Espírito Santo. Vitória: INCAPER, 2002. Disponível em: < [http:// www.incaper.gov.es.br](http://www.incaper.gov.es.br)> Acesso em: 3 fev 2003.

STANGARLIN, J. R.; SCHEWAN- ESTRADA, K. R. F. Plantas Medicinais e Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Biociencia e Desenvolvimento**, v.1, p. 16-21, 2000.

STEIN, B. D.; KLOMPARENNS, K; HAMMERSCHMIDT, R. Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants to *Colletotrichum lagenarium*. **Jornal of Phytopatology**, v.137, p.177-188, 1993.

STICHER, L. MAUCHI-MANI, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.235-270, 1997.

STICHER, L. MÉTRAUX, J. P. Inhibition of N-linked glycosylation induce systemic acquired resistance in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.56, p. 245-252, 2000.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M. HARBONE, J. B. (Org.). **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. cap. 10, p.387-416.

TENHAKEN, R.; LEVINE, A.; BRISSON, L.F.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.92, p. 4158-4163, 1995.

TSUKAYA, H.; OSHIMA, T.; NAITO, S.; CHINO, M.; KOMEDA, Y. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petúnia in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.97, p.1414-1421.

UKENES, S.; MAUCH-MANI, B; MOYER, M.; POTTER, S. WILLIAMS, S.; DINCHER, S.; CHANDLER, C.; SLUSARENKO, A.; WARD, E.; RYALS, J. Acquired resistance in *Arabidopsis*. **Plant cell**, v. 4, p. 645-656, 1992.

VALVERDE, R.A. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, v.74, n.3, p. 255-258. 1990.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.259-288, 1980.

VAN DER ACKERVEKEN, G. F. J. M.; DE WIT, P. J. G. M. The *Cladosporium fulvum*-tomato interaction, a model system for fungus-plant specificity. In: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Org.) **Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Oxford: Pergamon, 1995. v.2, cap. 9, p.145-160.

VAN LOON, L.C. The induction of pathogenesis-related proteins by pathogens and specific chemicals. *Neth.J.Plant Pathology*, v.89, p.265-273, 1983.

VAN LOON, L.C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal Plant Pathology**, v.103, p.753-765, 1997.

VAN LOO, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M.; GERAATS, B. M. P.; KNOESTER, M.; TON, J.; VAN WEES, S.C. M. Systemically induced resistance in arabidopsis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34.; São Pedro. **Anais...** São Pedro: Fitopatologia Brasileira, 2001. v.26, p.254.

VANDERPLANK, J. E. Sink-induced loss of resistance, high sugar disease processes and biotrophy. In _____ **Disease-resistance in Plants**. London: Academic Press, 1984. cap. 11, p.107-121.

WATTAD, C.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, n.2, p. 293-297, 1994.

WEI, Z.M.; LABY, R. J.; ZUMOFF, C.H.; BAUER, D. W.; HE, S. Y.; COLLMER, A.; BERR, S. V. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. **Science**, v.257, p.85-88, 1992.

WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.3, p. 428-435, 1999.

WURMS, K. LABBÉ, C.; BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Effects of Milsana and Benzothiadiazon on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. **Phytopathology**, v.89, n.9, p.728-736, 1999.

YAMAMOTO, M.; NAKATSUKA, S.; OTANI, H.; KOHMOTO, K.; NISHIMURA, S. Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. **Phytopathology**, v.90, n.6, p.595-600, 2000.

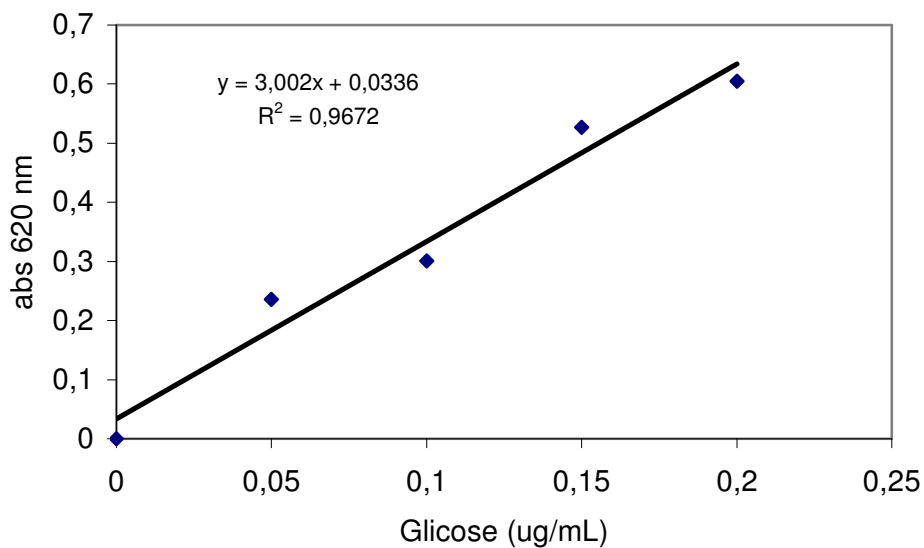
YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: In vivo evidence for the NR-dependent formation of active species. **FEBS Lett**, v. 468, p. 89-92, 2000.

ZHANG, Y.; FAN, W.; KINKEMA, M.; DONG, X.; LI, X. A. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.6523-6528, 1999,

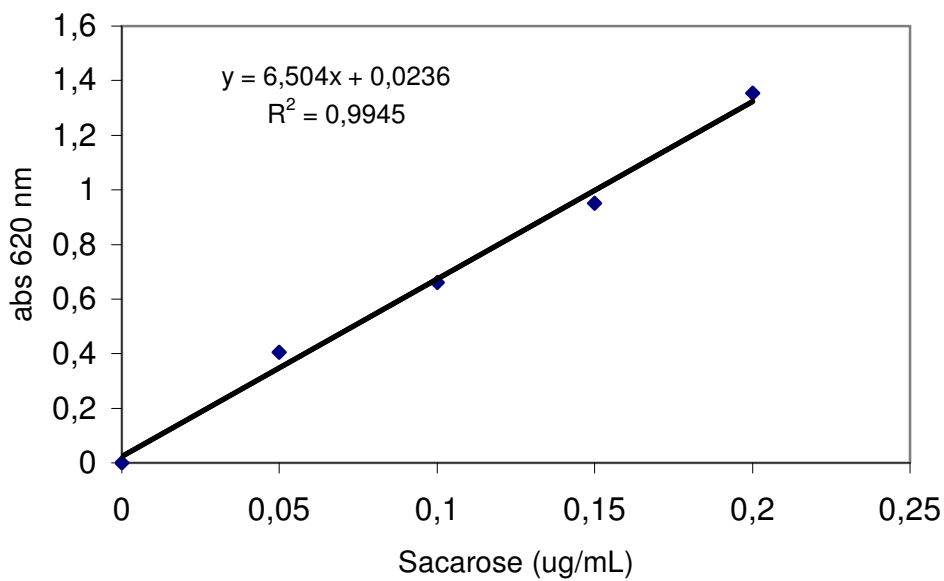
WANG, J.W.; WU, J.Y. Involvement of nitric oxide in elicitor-induced defense responses and secondary metabolism of *Taxus chinensis* cells. *Nitric Oxide*, v.11, p.298-306, 2004.

APÊNDICES

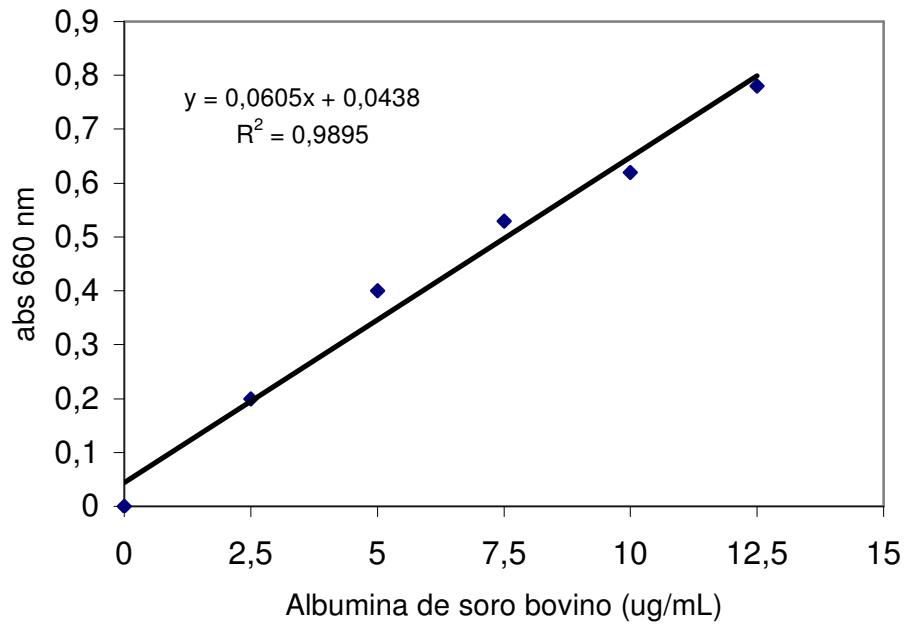
Apêndice A - Curva padrão para dosagem de glicose através do método de McCREADY et al (1950).



Apêndice B- Curva padrão para dosagem de sacarose através do método de McCREADY et al (1950).



Apêndice C- Curva padrão para dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry (1951)



Apêndice D- Curva padrão para dosagem de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

