

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

Germana Bueno Dias

**EFEITO ELICITOR DO ÓXIDO NÍTRICO NA
INDUÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA DO
MAMOEIRO**

Dissertação de Mestrado

Vitória, Dezembro / 2007.

GERMANA BUENO DIAS

EFEITO ELICITOR DO ÓXIDO NÍTRICO NA INDUÇÃO DO SISTEMA DE DEFESA DO MAMOEIRO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação de Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof^a Dr^a Patrícia M.B. Fernandes.

Vitória, Dezembro / 2007.

Germana Bueno Dias

Efeito Elicitor do Óxido Nítrico na Indução do Sistema de Defesa do Mamoeiro.

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Fisiologia Vegetal.

Aprovado em: 17 de dezembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Patrícia M.B. Fernandes – Orientador, UFES

Prof. Dr. José Aires Ventura – INCAPER

Prof^a. Dr^a. Adriana Silva Hemerly - UFRJ

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Dezembro de 2007.

Aos meus queridos Pais e Caio,
pelo amor, apoio, dedicação,
compreensão e total incentivo
para realizar este trabalho.

OFEREÇO

Ao meu Querido Umberto,
pelo incentivo, apoio e
compreensão.

DEDICO

Agradeço a todos os que contribuíram para o êxito desta dissertação, especialmente:

- A Deus, que me deu a vida, energia e sabedoria nas horas difíceis e alegria em muitos outros momentos.
- A Prof^a. Patrícia M.B. Fernandes pela orientação, oportunidade e confiança.
- Ao Prof. José Aires Ventura pela colaboração com o trabalho.
- Aos conselheiros membros da banca examinadora desta dissertação pelas sugestões.
- Aos Colegas do LBBM pelo apoio dado no laboratório, dicas, sugestões e pelos momentos de descontração (almoço na cozinha).
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.
- Aos meus amigos Fernanda e Vitor pelo carinho, incentivo e amizade.
- As minhas amigas: Thaiz, Márcia, Fernanda, Carol, Rogéria pela torcida e grande amizade de todos esses anos.
- A minha Família: Pais, Caio, Lú, Umberto pelo amor, carinho, compreensão, ajuda, paciência e essencialmente o incentivo.

Resumo

As plantas apresentam uma série de mecanismos que as tornam resistentes a doenças e pragas. Dessa forma, grupos de pesquisa de todo o mundo buscam definir o papel de cada substância participante dos processos bioquímicos de defesa das plantas. Tais estudos visam, dentre outras coisas, estabelecer plantas resistentes as principais doenças que ocorrem nas culturas. Uma das principais doenças que afetam plantações de mamão no Brasil é conhecida como meleira do mamoeiro, causada pelo *Papaya meleira virus* (PMeV). O objetivo desse trabalho foi avaliar a indução do sistema de defesa em mamoeiro (*Carica papaya* L.), cv. Golden pelo óxido nítrico (NO) e sua efetividade contra o PMeV. Para determinar os fatores histoquímicos e enzimáticos relacionados com as respostas de defesa induzidas pelo NO, incluindo a produção de espécies ativas de oxigênio, as plantas foram tratadas com o doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP) à 10 mM. As respostas de defesa foram analisadas nos tempos 0, 15, 30, 45 min, 1, 3, 6, 24; 48, 72 h, 15 e 30 dias após o tratamento. Essa resposta do SNP foi vista em todos os tempos analisados, mostrando a efetividade do NO nas plantas de mamoeiro. Esse estímulo desencadeado pelo SNP na indução da atividade da superóxido dismutase e peroxidase pode estar relacionado com o estresse oxidativo, pois a fim de combatê-lo, as plantas desenvolvem defesas, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Desta forma, concluímos que o uso do elicitor poderá induzir a resposta de resistência em mamoeiro.

Palavras-chave: *Carica papaya*, Espécies Reativas de Oxigênio, Estresse.

Abstract

Plants possess different mechanisms that make them resistant to diseases and pests. Thus, research groups around the world look out to the role of each participant substance on plant defense biochemical system. Such studies aim, among other things, to stabilize plants that are resistant to the main diseases that affect the orchards. One of the main diseases that affect papaya crops in Brazil is stick disease, caused by *Papaya meleira virus* (PMeV). The goal of this work was to analyze papaya seedling cv. Golden defense system induction by nitric oxide (NO) and its effectiveness against PMeV. In order to determine the histochemical and enzymatic factors related to NO defense response, including the production of reactive oxygen species (ROS), plants were treated with 10mM sodium nitroprusside (SNP), a NO donor. The defense response was analyzed in the following period: 0, 15, 30, 45 minutes, 1, 3, 6, 24, 48 and 72 hours and 30 days after treatment. The plant response to NO treatment was observed in all analyzed times, showing the NO effectiveness in papaya seedlings. The stimulus triggered by SNP in the induction of superoxide dismutase and peroxidase activity may be related to the oxidative stress, as, in order to fight it, plants develop defenses through the increase of antioxidant enzymes activity. Thus, we conclude that the use of NO as an elicitor could induce the resistant response in papaya seedlings.

Key word: *Carica papaya*, Reactive Oxygen Species, Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado do Espírito Santo, com destaque, em laranja, para os municípios produtores de mamão do Norte do Estado.....	14
Figura 2 - Principais sintomas da meleira do mamoeiro. (A) Necrose na ponta das folhas jovens. (B) Exsudação espontânea de látex aquoso na superfície dos frutos.....	16
Figura 3 - Modelo proposto para a relação entre o ataque do patógeno em uma célula hospedeira e a transdução de sinais que induzem a produção de ROS (espécies reativas do oxigênio).....	20
Figura 4 - Interconexões do H ₂ O ₂ , óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) para a ativação e coordenação das múltiplas reações de defesa das plantas (adaptado de Hammond-Kosack & Jones, 2000).....	26
Figura 5 - Dismutação pela superóxido dismutase, formando peróxido de hidrogênio.....	27
Figura 6 - Equações químicas ilustrando as principais enzimas chaves catalisando a formação e degradação de espécies ativas de oxigênio (EAO's) em plantas.....	29
Figura 7 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) após diferentes tempos de indução. Os tempos foram representado por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições...	36
Figura 8 - Corte transversal do pecíolo de mamoeiro (cv. Golden). Microscopia óptica de campo claro. Coloração: Nitroblue tetrazolium. (m) Controle (n) Planta tratada com SNP no tempo de 6h.....	39
Figura 9 - Atividade da superóxido dismutase (SOD) após diferentes tempos de indução e inoculação Os tempos foram representado por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições.....	40
Figura 10 - Atividade da peroxidase (POD) após diferentes tempos de indução. Os tempos foram representado por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições.....	42
Figura 11 - Corte transversal do pecíolo de mamoeiro (cv. Golden). Microscopia óptica de campo claro. Coloração: DAB. (m) Controle (n) Planta tratada com SNP no tempo de 6h.....	45
Figura 12 - Atividade da peroxidase (POD) após diferentes tempos de indução e inoculação Os tempos foram representado por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições...	46

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio singlete

ABA - Ácido abscísico

AIA - Ácido indolil-3-acético

APX - Ascorbato peroxidase

AVR - Gene de avirulência

CAT - Catalase

Cu/Zn - Cobre/zinco

Cv - Cultivar

DAB - 3,3 Diaminobenzidina

EDTANa₂ - Ácido Etileno Diamino Tetracético

Fe - Ferro

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HO[•] - Radical hidroxila

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural

JA - Jasmonato

KCN - Cianeto de potássio

MDAR - Monodeidroscarbonato redutase

Mn - Manganês

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NBT – Azul de nitro-tetrazolio

NIR - Nitrito redutase

NO - Óxido Nítrico

NO[•] - Íon nitroxil

NO⁺ - Íon nitrosonium

NO₂ - Dióxido de nitrogênio

NO₂[•] - Nitrito

NO₃[•] - Nitrato

NOS - Óxido nítrico sintase

NR - Nitrato redutase

O₂ - Radical superóxido

O₂^{•-} - Ânion superóxido

ONOO^{•-} - Peroxinitrito

PAL - Fenilalanina amônia liase
PIF - Produção Integrada de Frutas
PMeV - *Papaya meleira virus*
POD - Peroxidase
PR - Pathogenesis-related
PRPs - Pathogenesis-related proteins
PVPP - Polyvinylpoly-pyrrolidone
R - Gene de resistência
RH - Reação de hipersensibilidade
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
RSA - Resistência sistêmica adquirida
RSI - Resistência sistêmica induzida
SA - Ácido salicílico
SNP - Nitroprussiato de sódio
SOD - Superóxido dismutase
TMV - Vírus do mosaico do fumo
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
XO - Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	O MAMOEIRO: BIOLOGIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	13
2.2	A MELEIRA	15
2.3	MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL	16
2.4	RESPOSTA DE DEFESA EM PLANTAS: EXPLOSÃO OXIDATIVA.....	18
2.4.1	Oxido nítrico	21
2.4.2	Radical superóxido	27
2.4.3	Peróxido de hidrogênio	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
4.1.1	Plantas de mamoeiro – Cv. Golden	31
4.1.2	Inóculo de <i>Papaya Meleira vírus</i> (PMeV).....	31
4.2	TRATAMENTO DE PLANTAS COM O OXIDO NÍTRICO – NO	31
4.3	MICROSCOPIA ÓPTICA.....	32
4.3.1	Histoquímica	32
4.4	DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS	33
4.4.1	Dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD)	33
4.4.2	Dosagem da atividade da peroxidase (POD)	33
4.4.3	Determinação do conteúdo protéico total	34
5	RESULTADOS	35
5.1	INDUÇÃO DAS ENZIMAS OXIDATIVAS	35
5.1.1	Superoxido dismutase (SOD)	35
5.1.2	Peroxidase (POD).....	41
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	52
8	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

As plantas sofrem constantes agressões por agentes abióticos e bióticos, responsáveis por doenças e conseqüentemente pelas perdas na produção. Entretanto, são capazes de reagir às agressões através das respostas de defesa cujos mecanismos são acionados mediante a interação entre molécula elicitora e proteínas de membrana das células vegetais. Nem sempre a molécula elicitora pode atravessar a membrana e interagir com outra molécula (macro ou micro) no interior da célula.

A resistência natural das plantas a microorganismos patogênicos é baseada na grande variedade de barreiras estruturais, químicas e mecanismos de defesa já existentes, tais como: síntese de compostos, aumento na concentração e/ou atividades de proteínas de defesa (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1999) entre outras. Em contraposição, as plantas possuem outros mecanismos de defesa mais eficientes que permanecem inativos ou latentes, sendo acionados ou ativados, após a exposição e/ou contato com agentes de indução (FODOR *et al.*, 1998). Associado a isso ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS: do inglês *Reactive Oxygen Species*) tais como ânion superóxido (O_2^-), radical superóxido (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($HO^\bullet$), oxigênio singlete (1O_2) (FLORS and NONELL, 2006), óxido nítrico (NO) e seus derivados, peroxinitrito ($ONOO^-$), íon nitrosonium (NO^+) e íon nitroxil (NO^-) (PUERTO-ROMEROS *et al.*, 2004; AMILLO and GARCIA-OLMEDO, 2001; SALGADO *et al.*, 2002) ou que atuam direta ou indiretamente sobre o patógeno, causando efeito tóxico ou participando como sinalizadores de outras respostas de defesa (REZENDE *et al.*, 2003).

Atualmente, grande enfoque tem sido dado à agricultura sustentável visando à obtenção de sistemas da produção, alternativos ao uso abusivo de agrotóxicos. Neste sentido, a indução de resistência a doenças em plantas vem gerando resultados promissores e se firmando como alternativa ecologicamente correta e economicamente viável.

No Espírito Santo, a área cultivada com mamoeiro ultrapassa os 11 mil hectares, concentrando-se principalmente nos municípios da Região Norte. O Estado é o principal exportador nacional do mamão, respondendo por 70% da quantidade dos frutos exportados em 2005, de acordo com dados do (Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural) INCAPER. Em 1998, a implementação do Sistema de Mitigação de Riscos (*Systems Approach*), que assegura a exportação das frutas sem a presença da mosca-de-frutas, adequou o mamão capixaba às normas de exportação norte americana (APHIS/USDA), liberando as exportações para os Estados Unidos (PRATES, 2005). Adicionalmente, desde 2000, o cultivo de mamão vem sendo feito no sistema de Produção Integrada de Frutas (PIF) que objetiva a produção econômica de frutos de alta qualidade através de métodos que minimizam os efeitos colaterais do uso de agroquímicos para o ambiente e para a saúde humana, expandindo as exportações capixabas para ao comércio europeu (MARTINS, 2003). Por outro lado, alguns fatores limitam a produção de mamão, acarretando severas perdas na produção, comercialização e exportação de frutos *in natura*. Entre eles destacam-se economicamente as doenças, cuja ocorrência pode chegar a 100% em algumas plantações. Uma das principais doenças que afetam as plantações de mamão no Brasil é conhecida como meleira do mamoeiro, causada pelo *Papaya meleira vírus* (PMeV) (VENTURA *et al.*, 2003). Não existe ainda um cultivar de mamoeiro resistente à meleira, limitando o manejo desta doença à identificação e eliminação das plantas doentes no campo (VENTURA *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2006). Desta forma, estratégias capazes de induzir resistência do mamoeiro ao PMeV se tornam de grande importância.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O MAMOEIRO: BIOLOGIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A espécie *Carica papaya* L. pertence à família Caricaceae, tipicamente tropical, cujo centro de origem é, muito provavelmente, o noroeste da América do Sul – vertente oriental dos Andes, ou mais precisamente, a Bacia Amazônica Superior, onde sua diversidade genética é máxima.

O mamoeiro possui caule cilíndrico, com 10 a 30 cm de diâmetro, herbáceo, fistuloso, ereto, de coloração verde-clara no ápice e verde acinzentada na base, encimado por uma coroa de folhas, dispostas de forma espiralada. As folhas são grandes, com 20 a 60 cm, glabras, com pecíolos fistulosos, verde-pálido, vermelho-vinosos, geralmente de 50 a 70 cm de comprimento. As flores podem ser divididas basicamente em três tipos bem definidos: flor pistilada ou feminina típica, flor hermafrodita e flor estaminada ou masculina típica. O fruto é uma baga de forma variável de acordo com o tipo de flor, podendo ser arredondado, oblongo, alongada, cilíndrico ou piriforme. A casca é fina e lisa, de coloração amarelo-clara a alaranjada, protegendo a polpa com 2,5 a 5 cm de espessura e de coloração que pode variar de amarela a avermelhada. O fruto pode atingir até 50 cm. As sementes são pequenas, redondas, rugosas e recobertas por uma camada mucilagínosa, apresentando coloração diferente para cada variedade (Oliveira *et al.*, 1994 e Gay *et al.*, 1995). O mamão é um fruto climatério, ou seja, fruto que tem a capacidade de amadurecer depois de colhido, mesmo que verde, de grande aceitação no mercado brasileiro e no exterior (Oliveira *et al.*, 1994 e Gayt *et al.*, 1995).

O Brasil é o maior produtor e exportador de mamão do mundo com a produção de 1,7 milhões de toneladas/ano, correspondente a 35,4% do volume mundial. Embora distribuída por vários estados brasileiros, a Bahia e o Espírito Santo respondem por mais de 80% da produção brasileira dessa fruta destinada à exportação que apresenta grande importância social, gerando emprego o ano inteiro e tem se constituído numa importante fonte de divisas para o país (MARTINS, 2006).

Embora em segundo lugar em termos de produção nacional, ficando atrás da Bahia, o estado do Espírito Santo é o maior pólo de exportação da fruta e caracteriza-se pelo alto nível tecnológico empregado em seu cultivo. Responde, atualmente, por 70% da exportação brasileira e até o ano de 2006 era o único estado da Federação que possui tecnologia para exportar mamão para o exigente mercado dos Estados Unidos desde 1998 (MARTINS, 2006).

O Estado do Espírito Santo tem uma área plantada de 11.000 hectares, distribuídos em cerca de 300 propriedades, com uma produtividade média de 64,8 t/ha/ano nos principais municípios integrantes do pólo de mamão: Pinheiros, Linhares, Montanha, Jaguaré, Sooretama, Aracruz, São Mateus, Pedro Canário, Conceição da Barra, Boa Esperança e Mucurici (Figura 1).

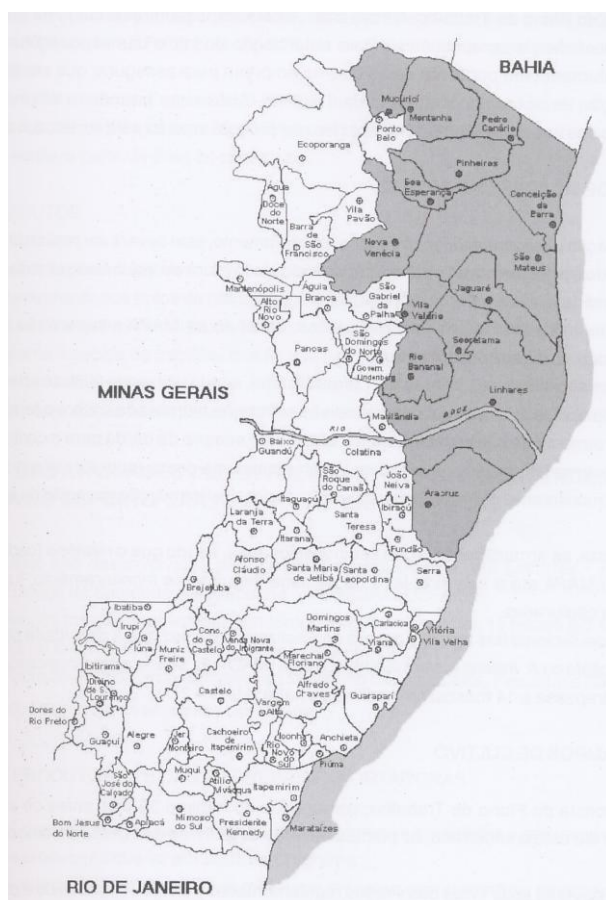


Figura 1 – Mapa do Estado do Espírito Santo, com destaque, em cinza, para os municípios produtores de mamão do Norte do Estado.

2.2 A MELEIRA

No Brasil, o mamoeiro é infectado por fitopatógenos, principalmente de vírus, tais como os do mosaico da meleira do mamoeiro. Relatada pela primeira vez na década de 80, em Teixeira de Freitas, BA e no Norte do Espírito Santo, a meleira constitui-se, atualmente, em um problema fitossanitário da cultura na região produtora. Devido à ocorrência dessa virose, os produtores de mamão vêm sofrendo grandes prejuízos na produção e a sua disseminação vem ocorrendo de forma crescente, atingindo os Estados da Bahia, Espírito Santo, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Paraíba e Goiás (VENTURA *et al.*, 2003).

Os primeiros sintomas da meleira são a queima e deformações nas bordas de folhas jovens (Figura 2A). Estes sintomas devem-se à necrose das pontas das folhas ocasionada por exsudação excessiva de látex de consistência mais fluida que o normal, dando aos frutos um aspecto enegrecido, devido à oxidação do látex em contato com o ar. Além disso, a consistência e o sabor dos frutos se alteram, tornando-os impróprios para a comercialização. Manchas claras na casca e na polpa dos frutos também são observadas (Figura 2B) (VENTURA *et al.*, 2003).

Com o objetivo de diminuir a disseminação da meleira, bem como evitar ou retardar sua introdução em áreas onde ela ainda não foi constatada, o grupo de pesquisa relacionado ao Agronegócio do Núcleo de Biotecnologia da UFES trabalha com esta doença há alguns anos, avaliando diferentes estratégias de diagnóstico molecular para o PMeV (RODRIGUES *et al.*, 2005a), mecanismos de inoculação e transmissão do vírus em mamoeiros (RODRIGUES *et al.*, 2006) e influências causadas pelo vírus na fisiologia da planta (RODRIGUES *et al.*, 2005b). Além destes, outros trabalhos foram desenvolvidos avaliando diferentes aspectos da doença (KITAJIMA *et al.*, 1993; ZAMBOLIM *et al.*, 2003). Mais recentemente, o genoma do vírus foi seqüenciado (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Entretanto, ainda não existe um cultivar de mamão resistente à meleira, limitando o manejo desta doença à identificação e eliminação das plantas doentes no campo (VENTURA *et al.*, 2003).

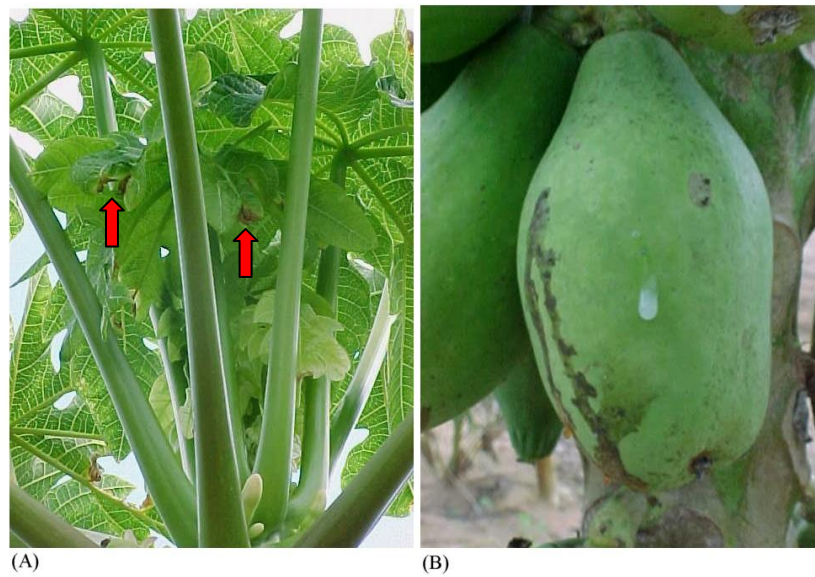


Figura 2 – Principais sintomas da meleira do mamoeiro. (A) Necrose na ponta das folhas jovens. (B) Exsudação espontânea de látex aquoso na superfície dos frutos (VENTURA *et al.*, 2001).

2.3 MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

A seleção natural e a co-evolução levaram as plantas a selecionarem uma série de mecanismos de defesa, sendo que as defesas identificadas em plantas resistentes estão também presentes em plantas suscetíveis. A diferença entre resistência e suscetibilidade pode ser o resultado de uma variação de tempo, autonomia celular ou intensidade das respostas de defesa das plantas (MORAES, 1998).

As interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis (patógeno virulento ou hospedeiro suscetível) e incompatíveis (patógeno avirulento ou hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência. Por outro lado, é tardiamente ativado ou não ativado em interações compatíveis, condicionando a doença. 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-a-gene (FLOR, 1942).

A indução de resistência já foi demonstrada em inúmeras espécies de plantas, distribuídas entre diversas famílias botânicas, tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (DELLEDONNE, 2005). A resistência induzida também se mostrou efetiva contra fungos, vírus, bactérias, insetos, ácaros e nematóides (LUCS, 1999; JONES, 2000; OGALLO *et al.*, 1996).

Deste modo, para facilitar o estudo, os mecanismos de resistência são divididos em duas categorias: pré e pós-formados. Cumpre mencionar que ambos podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos. Dentre os pré-formados estruturais, destacam-se a presença de cutícula, tricomas, tipo de estômatos, fibras e forma dos vasos condutores. Entre os bioquímicos, encontram-se os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, fitotoxinas e inibidores protéicos. Nos pós-formados, também chamados induzíveis, podem ser encontrados mecanismos estruturais, como papilas, halos, lignificação, formação de camadas de cortiça, calose, sílicio, tiloses em vasos, etc; e bioquímicos, tais como produção de fitoalexinas, proteínas-RP, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, inibidores de proteases, peroxidases, entre outros (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

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

A resistência local, conhecida como reação de hipersensibilidade (RH), pode levar à morte local das células situadas onde o elicitor se instala. O elicitor pode ser um ativador químico, extratos de células de microorganismos ou microorganismos vivos (DURRANT e DONG, 2004). Os aspectos fisiológicos e morfológicos 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, inchamento da mitocôndria devido à formação de poro de transição de permeabilidade precedendo a morte celular programada (JONES, 2000), além da síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas à defesa (PR: do inglês *pathogenesis-related*) (BOSTOCK, 1999; KUHN, 2006).

A RSA é induzida por patógenos ou ativadores químicos que envolve o acúmulo de proteínas relacionadas com patogênese (PRPs: do inglês *Pathogenesis-related proteins*) e é induzida por uma via salicilato-dependente.

Já na RSI, não há acúmulo de PRPs, não há alterações perceptíveis, o agente indutor é usualmente um não-patógeno, sua indução não é o salicilato-dependente, e sim uma outra rota de sinalização mais associada a jasmonatos e etilenos (STICHER *et al.*, 1997; VAN LOON, *et al.*, 1998).

Atualmente, o elicitor é definido por 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. Assim sendo, os termos de indutor e elicitor podem ser usados como sinônimos (ANDREU *et al.*, 1998).

Embora a indução de resistência tenha grande potencial fitossanitário, não deve ser encarada como uma solução redentora para todos os problemas, isso porque várias etapas envolvidas na ativação de mecanismos de indução de resistência ainda não são bem definidas. Alguns pesquisadores relatam que o uso de indutores de resistência para dado patógeno possa estar associado ao efeito indutor de suscetibilidade a doenças e animais herbívoros (CAMERON, 2000; MORAES, 1998).

O tratamento de plantas com essas moléculas elicitoras pode levar não apenas a uma resposta de resistência, mas a uma expressão sincronizada de diversos mecanismos de defesa, culminando com o que é chamado de indução de resistência. O fenômeno de indução de resistência é caracterizado pela transformação de uma relação originalmente compatível entre planta e patógeno numa relação incompatível (MEDEIROS *et al.*, 2003).

2.4 RESPOSTA DE DEFESA EM PLANTAS: EXPLOSÃO OXIDATIVA

Uma das principais respostas de defesa em plantas é o aumento da síntese de compostos, como as fitoalexinas, o aumento na concentração e/ou atividade das proteínas de defesa (MARGIS-PINHEIRO *et al.*, 1999) e também o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , OH^- e NO).

A explosão oxidativa é uma resposta de defesa das plantas após o reconhecimento da presença do patógeno, como a formação de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e óxido nítrico (Figura 3).

Estas moléculas ativas atuam diretamente sobre o patógeno causando efeito tóxico além de participarem como sinalizadoras de outras respostas de defesa (REZENDE *et al.*, 2003) sendo produzidas 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 ROS são geradas em relações planta-patógeno compatíveis e incompatíveis, no local da penetração e durante o estabelecimento da RSA. Elas estão relacionadas principalmente com o enrijecimento da parede celular, devido o aumento da lignificação e à formação de ligações cruzadas por glicoproteínas ricas em hidroxiprolina no estabelecimento da hipersensibilidade, estão relacionadas com a regulação de genes de defesa, incluindo enzimas antioxidantes, na peroxidação de lipídios e por sua ação direta antimicrobiana (GREENBERG, 1996; RICCI *et al.*, 1993).

No processo de desintoxicação celular, a ação combinada dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos é importante para evitar danos oxidativos celulares prejudiciais aos organismos vivos submetidos à variadas condições de estresses, pois converte os produtos potencialmente perigosos aos sistemas biológicos das ROS (SCANDALIOS, 1993).

O sistema de defesa enzimático é formado por enzimas capazes de remover, neutralizar ou limpar as ROS do interior das células de organismos vivos (SCANDALIOS, 1993). Dentre as principais enzimas antioxidantes podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase (POD) (investigadas neste trabalho) catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e monodeidrocarbonato redutase (MDAR) (PRASAD e RENGEL, 1998).

A escolha dessas enzimas para esta pesquisa foi devido à reação do NO com as espécies reativas de oxigênio, principalmente com o radical superóxido, gerando o peroxinitrito (OONO^-) e outros produtos que são muito tóxicos por causar nitração de proteínas e induzir a peroxidação lipídica, importante nas vias de respostas de defesa em plantas (CARRERAS *et al.*, 1994; GIASSEN *et al.*, 2002). Dados citados por DELLEDONNE *et al.* (2005) indicam que o NO coopera com as ROS na ativação da reação de hipersensibilidade (RH), então, aparentemente o NO possui um efeito de sinergismo com o peróxido de hidrogênio na indução de RH.

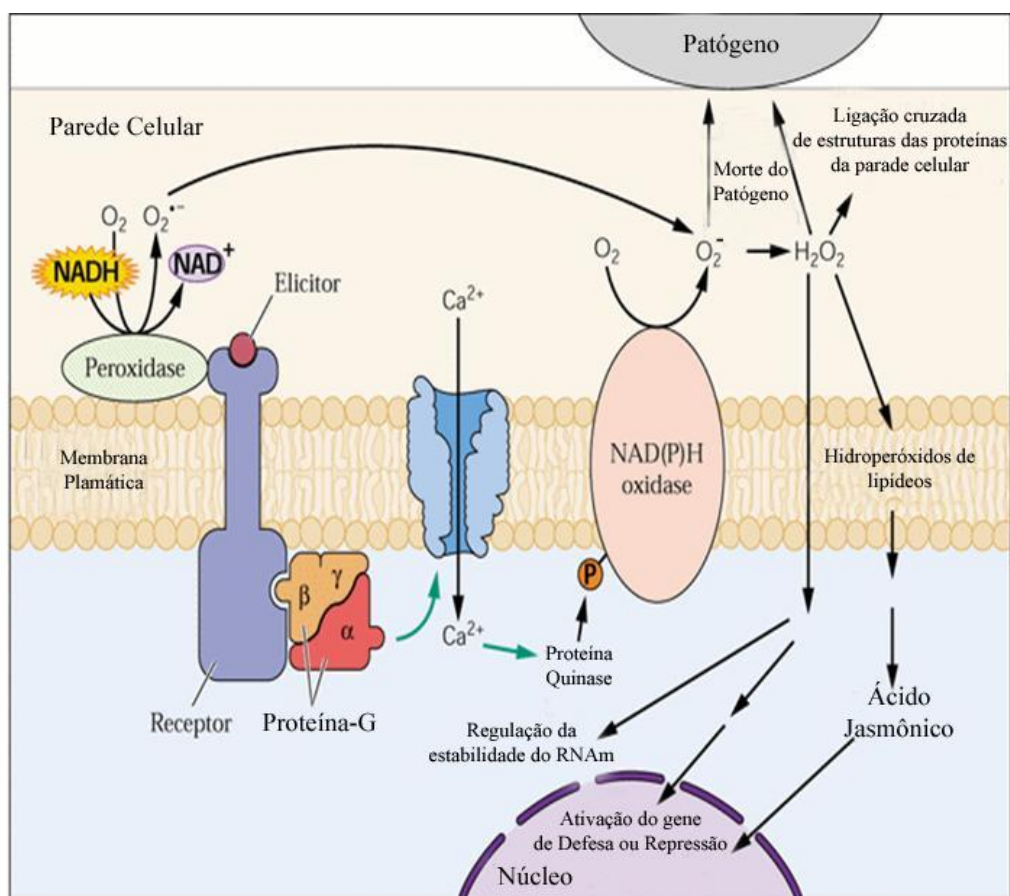


Figura 3 - Modelo proposto para a relação entre o ataque do patógeno em uma célula hospedeira e a transdução de sinais que induzem a produção de ROS (espécies reativas do oxigênio) (BUCHANAN *et al.*, 2000).

2.4.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora fundamental no reino vegetal, assim como no reino animal. É uma espécie radical centrada no átomo de nitrogênio, apresenta meia-vida de 1 a 10 seg, e desempenha importantes funções, tais como crescimento de raízes, germinação de sementes, fotomorfogênese, lignificação de parede celular, senescência, movimento de estômatos, via de sinalização por citocinas, aumento da disponibilidade de ferro, acúmulo de ferritina mediado por ferro, morte celular, funcionalidade mitocondrial e de cloroplastos, sinalização durante injúria, entre outros (Figura 4) (MODOLO *et al.*, 2002).

O NO funciona como um regulador negativo de alguns sinais relacionados com doadores de NO podendo inibir ou atrasar a expressão de genes, tais como: inibidores de proteinase no tomate, e pode reduzir a produção de peróxido de hidrogênio induzido (OROZCO-CARDENAS, 2002). Atua também como um mediador de processos fisiológicos tendo um número incrível de efeitos benéficos, funcionando como mensageiro de respostas imunes. Podendo transformar-se ainda em substâncias muito tóxicas, devido a sua taxa de produção e de difusão dependendo do estado redox da célula (DELLEDONNE, 2005). Como um modulador da resistência da doença, provoca a morte hipersensitiva da célula e ativa a expressão de diversos genes de defesa (ROMERO-PUERTAS *et al.*, 2004). Esta ampla variedade dos efeitos reflete os mecanismos básicos que são utilizados por todos os organismos vivos.

A maioria dos dados experimentais disponíveis a respeito da ação do NO durante interações planta-patógeno refere-se às infecções pelos patógenos biotróficos (ROMERO-PUERTAS *et al.*, 2004). O acúmulo de NO ocorre sob circunstâncias que são freqüentemente concomitantes com a explosão oxidativa gene-dependente avirulento que ocorre imediatamente antes do início da morte hipersensitiva da célula (DELLEDONNE *et al.*, 1998).

É sabido, também, que o NO induz o acúmulo do ácido salicílico (SA), mediador para o estabelecimento da resposta sistêmica da resistência. O tratamento com NO induz a acumulação de jasmonato (JA) e de genes JA-responsivos, tais como a defensina PDF1.2, mas somente nas plantas deficientes de SA (HUANG *et*

al., 2004). Consequentemente, o papel do NO nas respostas aos estresses bióticos parece ser ajustado pelo SA, que pode inibir a biossíntese de JA e antagoniza a ativação de respostas de defesa.

Delledonne *et al.* (2001) mostraram que o tratamento com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de óxido nítrico (NO), em concentrações entre 0.1 a 0.5 mM induziu células de soja 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 NO e ROS, com isto é observado que o NO possui papel tóxico e protetor. Junto com a geração de ROS o NO 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 H₂O₂ e NO em cultura de células de *Arabidopsis thaliana* quando estas foram expostas a estirpes não patogênicas de *Pseudomonas syringae*. Foi também encontrado um aumento na produção de NO na epiderme de tabaco induzido por um elicitador (FOISSNER *et al.*, 2000).

Igualmente relevante, o NO apresenta importante papel como sinalizador da resposta de hipersensibilidade (RH) em plantas durante uma interação incompatível. Um efeito sinérgico entre o NO e espécies reativas de oxigênio mostrou potencializar a RH em vegetais (DELLEDONE, 2005). Ainda a esse respeito, Clarke *et al.* (2000) mostraram que apenas o NO é capaz de induzir morte em culturas de células de *A. thaliana* de maneira similar à observada na tentativa de infecção destas células com uma bactéria avirulenta.

Apesar de o NO ter se mostrado polivalente no controle e indução de muitos processos que ocorrem em plantas, o mecanismo molecular responsável por sua síntese ainda é controverso. A análise de vários tecidos vegetais demonstrou que estes são capazes de produzir L-citrulina a partir de L-arginina em um processo que é dependente dos cofatores para a óxido nítrico sintase (NOS) de mamíferos e sensível a análogos da L-arginina (DELLEDONNE *et al.*, 1998; DURNER *et al.*, 1998; MODOLO *et al.*, 2002; BARROSO *et al.*, 1999).

Diversos estudos comprovaram que enzimas do tipo óxido nítrico sintase (NOS) de mamíferos estão envolvidas na síntese de NO durante a resposta de

defesa de plantas. Pesquisas mostram também a ação do NO sobre aconitase, enzima do ciclo de Krebs em plantas, esta ação causa grande liberação de ferro livre, importante na defesa contra patógenos (DELLEDONNE *et al.*, 1998; DURNER *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2004; MODOLO *et al.*, 2002). Navarre *et al.*, (2000), examinaram o efeito do NO sobre aconitase em tabaco (*Nicotiana tabacum*), a descoberta de que o NO inibe a aconitase sugere uma grande variedade de mecanismos pelo qual o NO pode mediar a resistência a doenças ou a outros processos fisiológicos. Tais evidências indicam que o NO é uma molécula sinalizadora em plantas.

O NO foi caracterizado de modo recente como indutor da expressão de genes relacionados com a biossíntese de fitoalexinas em soja (*Glycine max*) (DELLEDONE *et al.*, 2001), fumo (*Nicotiana tabacum*) (DURNER *et al.*, 1998) e batata (*Solanum tuberosum*). Observou-se a indução de resposta de hipersensibilidade em *Kalanchoe daigremontiana* e *Taxus brevifolia* pelo NO (PEDROSO *et al.*, 2000). 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 e à bactéria *Ralstonia solanacearum*. Foi observado também que a inibição da produção de óxido nítrico compromete as respostas de defesa de *Arabidopsis* a infecção da bactéria *Pseudomonas syringae*. Em conjunto, estes resultados apontam para um papel sinalizador do NO no processo de defesa em plantas (HUANG *et al.*, 2004, BOSTOCK, 1999; PEDROSO *et al.*, 2000a).

Ultimamente, pesquisas mostraram que a eliciação de cotilédones de soja com oligossacarídeos de parede celular do fungo *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, agente causador da doença cancro da haste em soja, induziu a produção de fitoalexinas via ativação de uma enzima do tipo NOS dependente de cálcio (MODOLO *et al.*, 2002). A atividade máxima da enzima precedeu o acúmulo das substâncias antimicrobianas e inibidores da NOS de mamíferos comprometendo a resposta dos cotilédones.

Estes resultados sugeriram que uma enzima com atividade conversora de L-arginina em L-citrulina é ativada durante a interação soja-*D. phaseolorum*, ocasionando um aumento na produção de NO que sinaliza a ativação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL), uma enzima que participa da via de síntese de

fitoalexinas com atividade antimicrobiana (DELLEDONNE *et al.*, 1998). Assim sendo, estes resultados indicam o NO como uma importante molécula ativadora da via dos fenilpropanóides para a produção de compostos antimicrobianos.

Embora muitos trabalhos citam a ocorrência de uma enzima do tipo NOS em plantas, mecanismos adicionais para a produção enzimática de NO são propostos, dentre eles a atividade de nitrato redutase (NR), xantina oxidase (XO), atividade produtora de NO associada à membrana plasmática (NI-NOR), citocromo P-450 e nitrito redutase (NiR). Vale ressaltar que mecanismos não-enzimáticos de produção de NO também podem ocorrer em plantas (MAGALHÃES *et al.*, 2000). A esse respeito, Cooney *et al.* (1994) reportaram que o dióxido de nitrogênio (NO_2) pode gerar NO na presença de carotenóides, num processo mediado pela luz. Além disso, a formação de NO pode ocorrer a partir da redução de nitrato (NO_3^-) ou nitrito (NO_2^-) na presença de ascorbato. De fato, camadas de aleurona de cevada consumiram NO_2^- para a formação de NO a partir de condições de acidez do espaço apoplástico (COONEY *et al.*, 1994).

Ainda que vários resultados bioquímicos e imunológicos indiquem a existência de uma enzima do tipo NOS em plantas, o gene ou uma proteína homóloga a NOS de mamíferos ainda não foi encontrado de maneira geral. Chandok *et al.* (2003) isolaram uma proteína P da glicina descarboxilase com atividade NOS a partir de folhas de fumo infectadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV). A atividade desta enzima mostrou ser dependente de Ca^{2+} e esta proteína apresentou várias propriedades bioquímicas características da NOS de mamíferos. Inicialmente, a análise molecular da proteína purificada revelou que esta é uma variante da proteína P do complexo glicina descarboxilase não apresentando assim, homologia com a NOS de mamíferos. Apesar de ser dependente de cálcio, a enzima isolada foi denominada NOS induzida (iNOS) por estar presente praticamente apenas em folhas de fumo infectadas com o vírus TMV (BETHKE *et al.*, 2004).

Adicionalmente, Guo *et al.* (2003) identificaram um gene de *A. thaliana* (*AtNOS1*) que codifica uma proteína com atividade conversora de L-arginina em L-citrulina e NO. *AtNOS1* é uma proteína homóloga àquela responsável pela síntese de NO em *Helix pomatia*. Uma linhagem mutante isogênica deficiente para este gene foi isolada e apresentou considerável redução da produção de NO (GUO *et al.*,

2003). Foi observado aumento da produção deste radical em plantas selvagens tratadas com ácido abscísico (ABA), mas não naquelas mutantes deficientes no gene *AtNOS1*, sugerindo o envolvimento desta enzima na via de sinalização hormonal por ABA. A atividade de *AtNOS1* foi sensível a L-NAME, um inibidor da NOS de mamíferos, e apresentou dependência de NADPH, calmodulina e cálcio (GUO *et al.*, 2003). No entanto, tetrahydrobiopterina, FAD, FMN ou heme não estimularam a atividade de *ATNOS1*, o que mostra que esta enzima apresenta apenas algumas das propriedades descritas para a NOS de animal.

Recentemente, He *et al.* (2004) mostraram que plantas de *A. thaliana* deficientes na síntese de *AtNOS1* florescem prematuramente quando comparadas às plantas selvagens ou àquelas mutantes que produzem NO em quantidades aumentadas. Inicialmente, esta enzima foi apontada como uma fonte de NO durante a via de sinalização por ABA. Mais ainda, Zeidler *et al.* (2004) demonstraram a ocorrência de ativação da *AtNOS1* em folhas de *A. thaliana* eliciadas com lipopolissacarídeos de diferentes bactérias gram-negativas. A ativação de *AtNOS1* provocou um aumento na síntese de NO que por sua vez mediou a ativação da expressão de vários genes relacionados à defesa conferindo imunidade inata às plantas de *A. thaliana*. O silenciamento do gene *AtNOS1* causou uma dramática suscetibilidade das plantas ao patógeno avirulento *P. syringae* pv. *tomato* por prevenir a indução de genes de defesa tanto local quanto sistêmica.

O NO, assim como as ROS, é capaz de alterar a expressão de genes relacionados à defesa como PR1 e PAL em tabaco e soja (DELLEDONNE *et al.*, 1998; DURNER *et al.*, 1998).

O NO coopera com as ROS 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 fenilpropanoides onde há produção de lignina, peroxidases, SODs, catalases, fitoalexinas e ácido salicílico (DELLEDONNE *et al.*, 1998; DURNER, 1998; HUANG *et al.*, 2002).

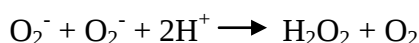
Como dito anteriormente, as ROS e o NO fazem parte de respostas de defesa nas plantas, entretanto, o seu acúmulo na célula é prejudicial. Para evitar este acúmulo a célula dispõe de vários mecanismos para detoxificar, sendo bem

2.4.2 Radical superóxido

Este radical é o mais comum e abundante na célula vegetal (Boveris, 1998), podendo ser gerado em eventos de transporte de elétrons que ocorrem em cloroplastos e microssomos do retículo endoplasmático, ou por reações de autooxidação do oxigênio molecular (SANTORO e THIELE, 1997).

A enzima SOD (superóxido dismutase) catalisa a dismutação do O_2^- à H_2O_2 (Figura 5), apresentando-se na forma de isoenzimas (BOWLER *et al.*, 1992). Estas metaloenzimas multiméricas têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) ou ferro (Fe) (SCANDALIOS, 1993). A Mn-SOD, normalmente localizada na mitocôndria, é resistente ao KCN e ao H_2O_2 , a Cu/Zn-SOD, localizada nos cloroplastos, é inativada por KCN e por H_2O_2 e a Fe-SOD, também associada aos cloroplastos, é resistente ao KCN e inativada por H_2O_2 . As Cu/Zn-SODs e algumas Mn-SODs e Fe-SODs de procariotos são diméricas, enquanto as Mn-SODs das mitocôndrias e de algumas bactérias termófilas são tetraméricas (SCANDALIOS, 1993). As isoenzimas da SOD são ubíquas em organismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos e alguns anaeróbicos obrigatórios, protegendo-os contra os danos oxidativos através da remoção do radical O_2^- . Estas enzimas são codificadas no núcleo e então transportadas para seus locais organelares por meio de seqüências marcadas com NH_2 terminais. São as únicas enzimas cujas atividades determinam as concentrações de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss que origina os radicais OH^- e provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (BOWLER, 1992).

Superóxido Dismutase



Mn-SOD: mitocôndria

Fe-SOD: cloroplasto

CuZn-SOD: cloroplasto

CuZn-SOD: citosol

Figura 5 - Dismutação pelo superóxido dismutase, formando peróxido de hidrogênio.

2.4.3 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre por definição, porém é um intermediário reativo do oxigênio que se torna perigoso pelo alcance que tem, e por não reagir imediatamente, pois o H_2O_2 pode migrar pela célula e atingir alvos distantes do local de sua formação. É uma ROS importante por sua capacidade de gerar o radical hidroxil ($HO^\cdot$) em presença de metais como ferro. O H_2O_2 é formado principalmente na matriz mitocondrial, durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido pela enzima SOD (FRIDOVICH, 1998). Além de ser formado na reação de dismutação do superóxido e por fagócitos, também é um subproduto da assimilação oxidativa de várias fontes de carbono e nitrogênio, por peroxissomos e glioxissomos (FORMAN e THOMAS, 1986).

As peroxidases são enzimas que participam de vários processos fisiológicos. Entre as reações que participa, está a produção de lignina. 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 peroxidase catalisa a oxidação e polimerização de álcool hiroxicinâmico em presença de peróxidos de hidrogênio (STRACK, 1997; ABELLES e BILES, 1991). Ela também participa da incorporação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina à parede celular e destruição peroxidativa do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAN, 1990) e de outros reguladores de crescimento (BARZ e KOSTER, 1981). As peroxidases participam ainda da biossíntese do etileno e da oxidação de compostos fenólicos, acumulando-se em resposta a um elicitor (ASADA, 1992). A atividade desta enzima pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade de diferentes hospedeiros na presença de diferentes patógenos ou elicitores (ASADA, 1992).

A atividade da enzima está relacionada à resistência de cultivares, sendo 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.

Superóxido dismutase (SOD)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot -} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ $\text{O}_2^{\cdot -} + \text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Ascorbato Peroxidase (APX)	$\text{APX} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Composto I} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Composto I} + \text{Ascorbato} \rightarrow \text{Composto II} + \text{MDA}^{\cdot (*)}$ $\text{Composto II} + \text{Ascorbato} \rightarrow \text{APX} + \text{MDA}^{\cdot (*)} + \text{H}_2\text{O}$
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

MDA^{·(*)}: Radical monodehidroascorbato

Figura 6 - Equações químicas ilustrando as principais enzimas chaves catalisando a formação e degradação de espécies ativas de oxigênio (ROS) em plantas (REZENDE *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a indução do sistema de defesa em mamoeiro (*Carica papaya* L.), cv. Golden, pelo óxido nítrico (NO) e sua efetividade contra o vírus da meleira do mamoeiro (PMeV).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) em folhas de mamoeiros da cv. Golden após tratamento com NO.

- Avaliar histoquimicamente a síntese de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em mudas de mamoeiro tratadas com NO.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.1 Plantas de mamoeiro – Cv. Golden

As sementes provenientes do INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural) foram plantadas em 40 vasos de nº 04 contendo uma mistura de terra orgânica e areia (3:1 v/v). As 40 plantas foram irrigadas 3 vezes por semana e cultivadas em telado para aclimação até o quarto mês após a germinação. Posteriormente foram acondicionadas em caixas de vidro a uma temperatura média de 20°C, sob fotoperíodo de 12 horas.

4.1.2 Inóculo de *Papaya meleira vírus* (PMeV)

Látex coletados a partir de plantas doentes foi utilizado nos tratamentos como fonte de inóculo para o PMeV. Nas mudas do cv. Golden, de quatro meses de idade, foram injetados cerca de 20 µl de látex infectado fornecido pelo INCAPER/ES (Rodrigues, 2006). As inoculações foram realizadas com uma seringa cirúrgica comum de 5 mL no ápice e no pecíolo das plantas em diferentes profundidades (aproximadamente 1 cm).

Cinco plantas foram utilizadas no tratamento com o elicitor (SNP), enquanto outros cinco permaneceram inoculados sem o elicitor, representando o controle negativo.

4.2 TRATAMENTO DE PLANTAS COM O ÓXIDO NÍTRICO – NO

Mudas de mamão foram tratadas através de pulverização com o doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP) a 10 mM. As plantas foram divididas em cinco grupos: 1) plantas não tratadas; 2) plantas pulverizadas com água; 3) plantas

pulverizadas com nitroprussiato de sódio (SNP); 4) plantas inoculadas com o vírus PMeV e 5) plantas pulverizadas com SNP e concomitantemente inoculadas com o PMeV.

As respostas de defesa (aumento das ROS) foram analisadas nos tempos 0; 15; 30; 45 min; 6; 24; 48; 72 horas; 15 e 30 dias após o tratamento para todos os tratamentos.

4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA

A caracterização histoquímica foi realizada utilizando o pecíolo de folhas de mamoeiro (cv. Golden) como teste. Os resultados relativos à microscopia óptica foram documentados digitalmente em microscopia de campo claro em microscópio LEICA®, equipado com câmera Moticom® 2000 / 2.0 Pixel, acoplado ao sistema Motic Plus / Soft Imaging System de processamento digital de imagens.

4.3.1 Histoquímica

As análises foram realizadas de material a fresco das amostras submetidas aos tratamentos, conforme descrito no item 4.2, coradas com: Azul de nitro-tetrazólio (NBT), para detecção de O_2^- tecidual e com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), para detecção do H_2O_2 tecidual.

Detecção de superóxido (O_2^-)

A detecção de O_2^- tecidual foi realizada conforme Jabs *et al.* (1996) com algumas modificações. Cortes transversais do pecíolo foram realizados à mão livre e depositados em placas de Petri contendo uma solução de NBT 0,5 mM, pH 7,4, por 12 h. Amostras controle foram mantidas apenas em água deionizada. Todos os cortes foram descorados em etanol 96% fervente, durante 20 min, e montados entre lâmina e lamínula em água glicerizada à 50%.

Deteccão de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A detecção do H₂O₂ tecidual foi realizada conforme Jabs *et al.* (1996) com algumas modificações. Cortes transversais do pecíolo foram realizados à mão livre e depositados em placas de petri contendo uma solução de DAB-HCl 5,0 mM pH 3,8, durante 12 h. Amostras controle foram mantidas apenas em água deionizada. Todos os cortes, foram descorados em etanol 96% fervente, durante 20 min, e montados entre lâmina e lamínula em água glicerizada à 50%.

4.4 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

4.4.1 Dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da superóxido dismutase foi realizada conforme Osswald *et al.* (1992). As folhas congeladas (0,3 g) foram homogeneizadas com Polyvinylpoly-pyrrolidone (PVPP) e solução contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,5), EDTA-Na₂ 1 mM, NaCl 50 mM e ácido ascórbico 1 mM e centrifugadas (11.000 rpm, 30 min, a 4 °C). Foram adicionados ao sobrenadante: 0,5 mL de EDTA-Na₂ 0,54 mM, 0,8 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 0,5 mL de metionina 0,13 mM, 0,5 mL de azul *p*-nitrotetrazólio (NBT) 0,44 mM e 0,2 mL de riboflavina 1 mM. A solução resultante foi exposta a luz fluorescente (80 W) por 20 min. Extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (λ = 560 nm) em ambos os tipos de extrato (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorbâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que consistiu na inibição da redução do NBT pela dismutação enzimática do superóxido. A atividade foi expressa em Abs/min/mg de proteína.

4.4.2 Dosagem da atividade da peroxidase (POD)

A determinação da atividade de peroxidase foi realizada conforme Roncato e Pascholate (1998) com algumas modificações. Foram triturados 0,3 gramas de plantas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras trituradas foram ressuspensas em 4 mL do tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) à 4 °C. O extrato foi

centrifugado a 11.000 rpm por 25 minutos à 4 °C e o sobrenadante coletado. Foram adicionados a 60 µL do sobrenadante: 0,9 mL de tampão de reação (0,153 µL de H₂O₂, 0,125 µL de guaiacol em 50 mL de tampão de extração) e 40 µL do tampão de extração. A leitura foi realizada a 470 nm e a atividade expressa em Abs/min/mg de proteína.

4.4.3 Determinação do conteúdo protéico total

O conteúdo protéico da muda foi determinado segundo o método de Lowry (1951) e a leitura realizada em espectrofotômetro à 660 nm.

Para preparação da amostra, 0,3 gramas de plantas 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 20.000 g 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 N, 1 mL de tartarato de sódio e potássio 4% e 1 mL de sulfato de cobre 2%. 1 mL do EBP foi adicionado à 5 mL do reagente de cobre e a mistura foi misturada. Após 10 minutos, foi adicionado 500 µL do reagente de fenol, que consiste em 1 volume de reagente de Folin e 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.

5 RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO DAS ENZIMAS OXIDATIVAS

5.1.1 Superoxido dismutase (SOD)

Folhas de mudas de mamão cv. Golden, após pulverização com o doador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), a 10 mM, foram coletadas e analisadas quanto a atividade da enzima SOD. Observou-se um aumento na atividade desta enzima nos diferentes tempos pós-tratamento, correspondente à indução desta pelo NO.

Nas condições do experimento, imediatamente após o tratamento, ou seja, nos primeiros minutos, observou-se um aumento da atividade da SOD nas plantas de mamoeiro pulverizadas com SNP. Este aumento foi significativo quando comparado com as plantas controle pulverizadas com água ou sem nenhum tratamento. Entretanto, após 15 minutos do tratamento com o NO ocorreu um decréscimo da atividade da enzima. Porém, outro pico de atividade foi observado no tempo de 30 minutos após o tratamento. Nos períodos subseqüentes, de 45, 60, 180, 360 min, 15 e 30 dias, ocorreu um decréscimo na atividade, mas que ainda permaneceu elevada quando comparada aos controles. Portanto, o pico da atividade da SOD ocorreu no tempo 0 e 30 minutos após o tratamento com NO (Figura 7).

Visando identificar a região da folha em que se concentrava a enzima SOD ativa, folhas destas mesmas plantas foram analisadas quanto a formação de radicais superóxidos. Desta forma, testes histoquímicos foram realizados e a análise foi efetuada por microscopia ótica.

Verificou-se, portanto, que a atividade enzimática da SOD se localiza principalmente no floema e xilema e, em menor proporção, em células próximas à epiderme e subepiderme (Figura 8 d, h, i).

Foram observadas grandes diferenças na intensidade de coloração, indicativas de diferenças nos níveis de atividade enzimática adsorvida na membrana. Apesar da reação de transformação dos radicais superóxido em peróxido de

hidrogênio, catalisado pela SOD, também ter ocorrido nas plantas controle, nitidamente o tratamento com NO foi efetivo na indução da SOD, já que nas plantas pulverizadas com SNP a coloração observada foi muito mais forte (Figura 8 a, c, e).

Foi observada uma relação direta dos resultados de histoquímica com os de atividade enzimática. Esta relação se tornou ainda mais nítida no período de 30 min pós tratamento, mostrando um pico maior na atividade da enzima e uma visualização mais nítida na formação do superóxido na região do xilema e floema da planta de mamoeiro tratada com SNP (Figura 8 f).

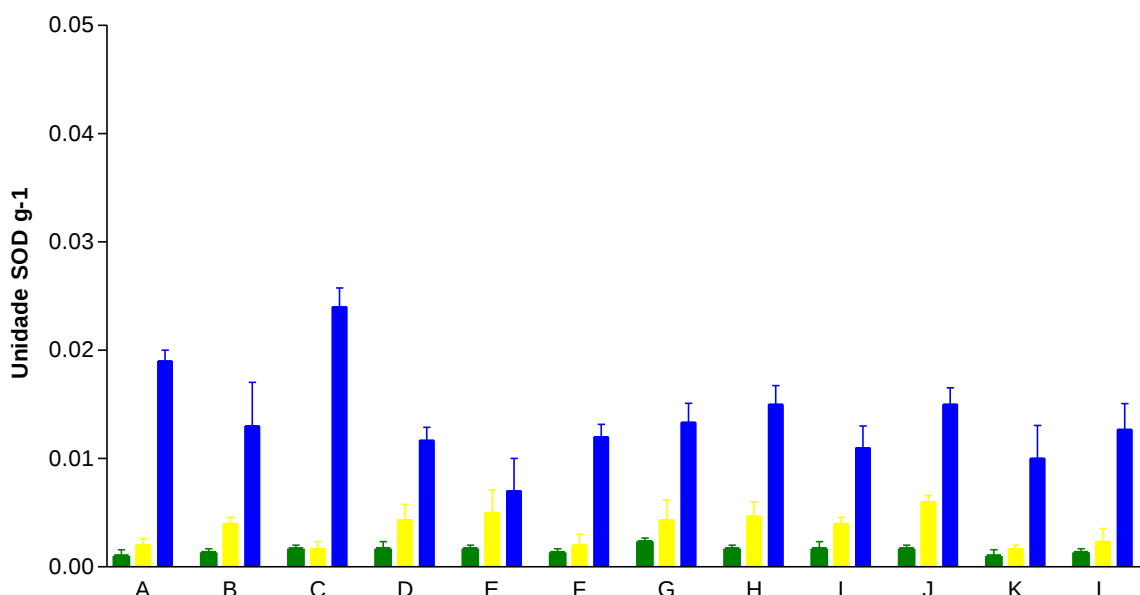
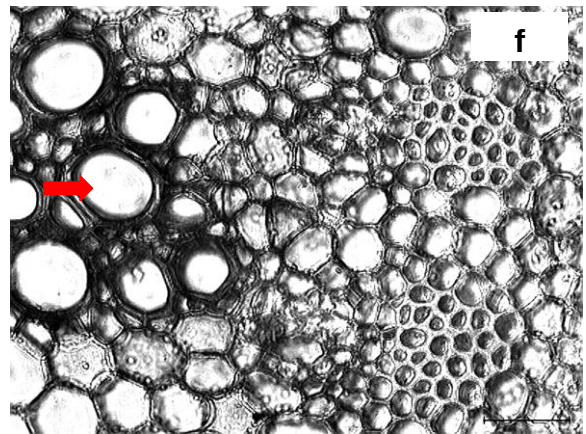
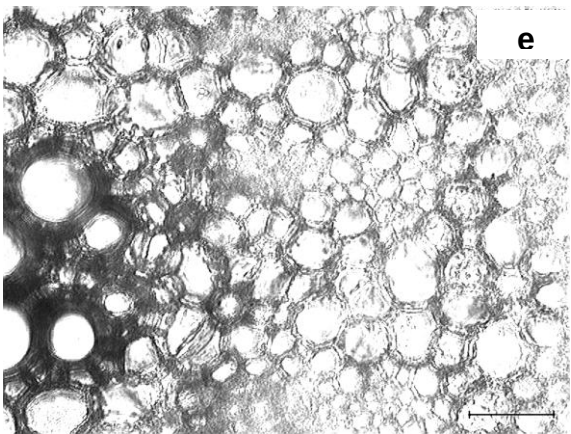
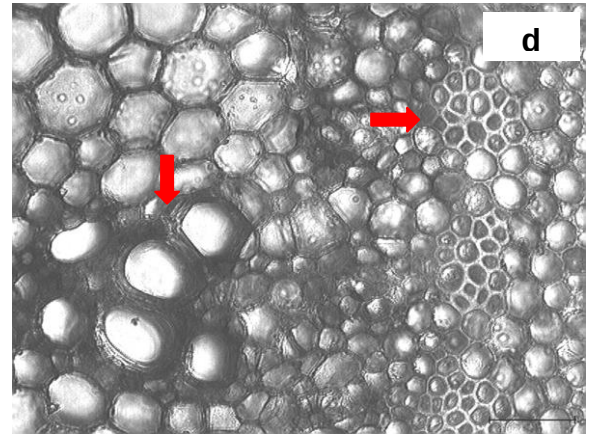
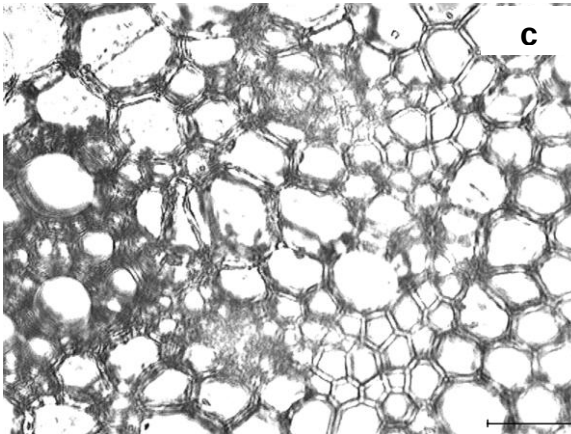
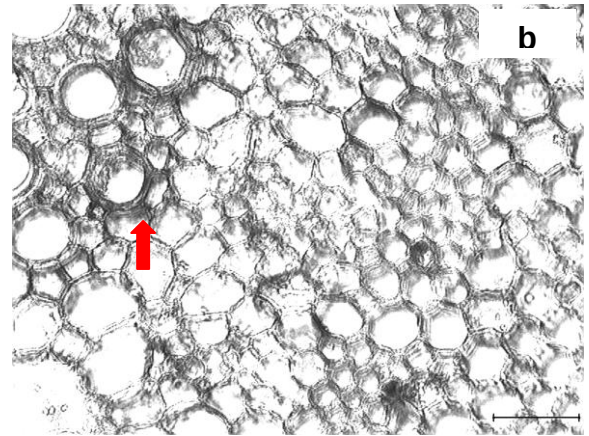
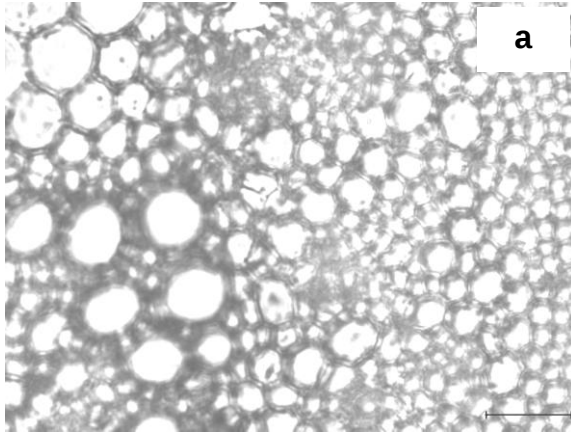
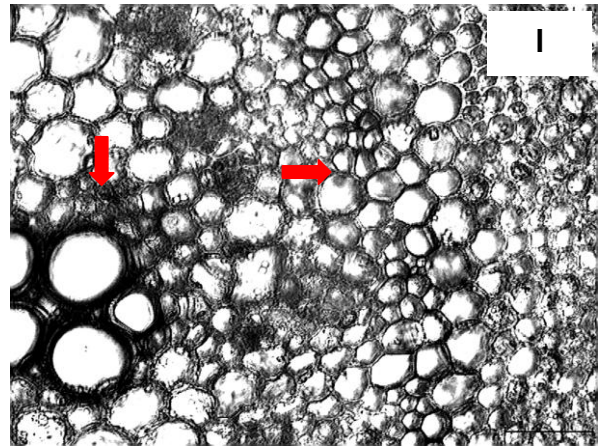
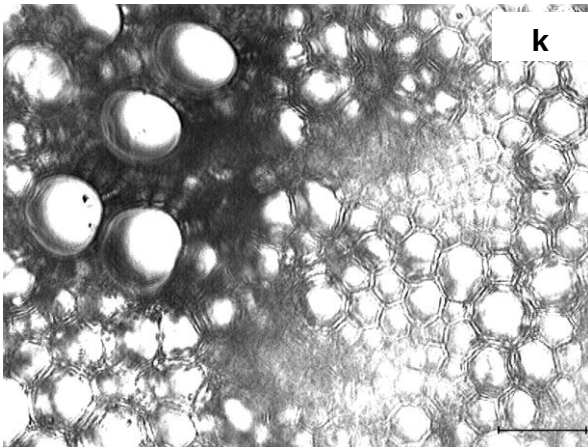
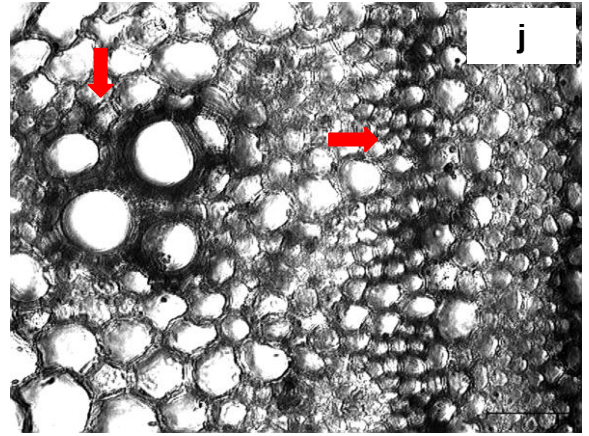
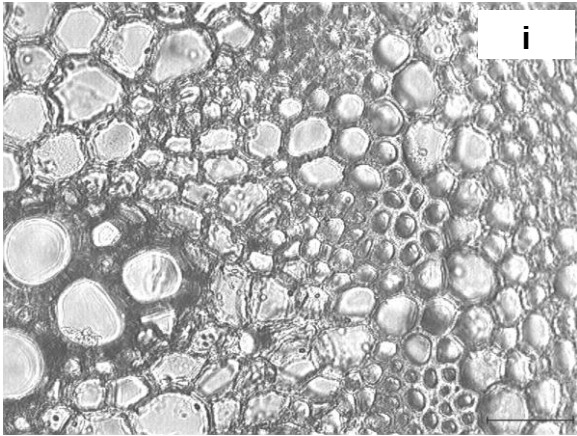
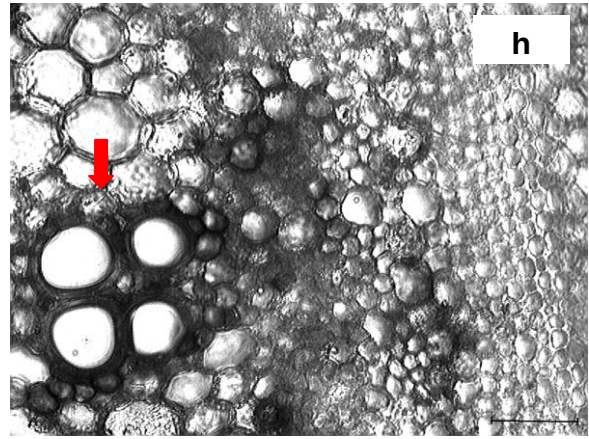
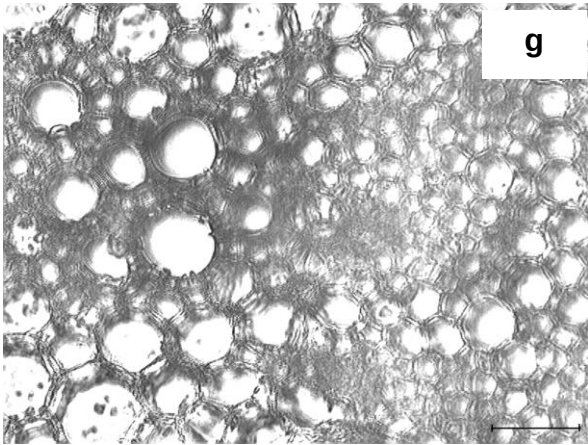


Figura 7 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) após diferentes tempos de indução. Os tempos foram representado por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições. ■ Controle; ■ Tratada com água; ■ Tratada com NO.





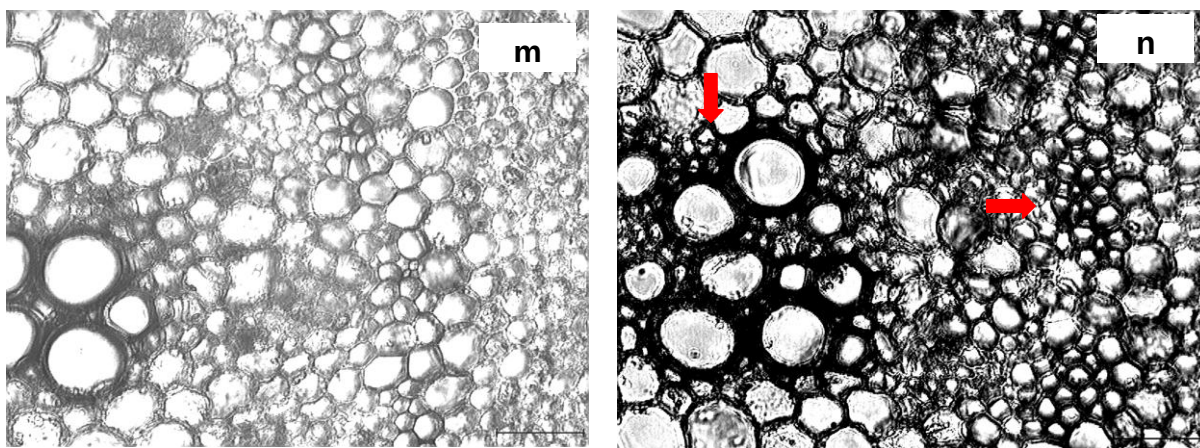


Figura 8 (a – n) Microscopia óptica de campo claro de cortes transversais do pecíolo de mamoeiro (cv. Golden). Após coloração com Azul nitro-tetrazol. As siglas a, c, e, g, i, k e m representam as plantas controle nos tempos 0, 15, 30, 45 min e 1, 3, 6, 24, 48, 72 h, 15 e 30 dias, respectivamente; enquanto b, d, f, h, j, l e n representam as plantas tratadas com NO nos mesmos tempos. Barra = 100 μ m.

Como o tratamento com NO, através da pulverização de mudas de mamoeiro com SNP, foi capaz de induzir a atividade da SOD, passou-se, então, ao estudo deste sistema quando a planta é inoculada com o vírus da meleira do mamoeiro.

Para uma melhor análise da resposta de mudas de mamoeiro pulverizadas com SNP e inoculada concomitantemente com PMeV, foi introduzido um novo controle, somente da inoculação de tampão fosfato, visando descartar o efeito da injúria feita pela agulha na planta.

Observou-se um aumento na atividade da enzima SOD, em todos os tempos analisados, quando concomitante tratamento com NO e inoculação com PMeV. Apesar das plantas controles também terem apresentado um estímulo desencadeado pelo NO, demonstrado pelo aumento da atividade da SOD, as mudas de mamoeiro tratadas com SNP e concomitantemente inoculadas com PMeV apresentaram atividade da SOD significativamente maior (Figura 9). Neste caso, um pico de atividade ocorreu nos tempos 0, 1 e 24 h pós-tratamento.

O aumento da atividade da SOD observado nas plantas pulverizadas com SNP e concomitantemente inoculadas com PMeV ocorreu até o período de 15 dias;

não tendo mais uma atividade significativa no período de 30 dias pós-tratamento, conforme apresentado na figura 9.

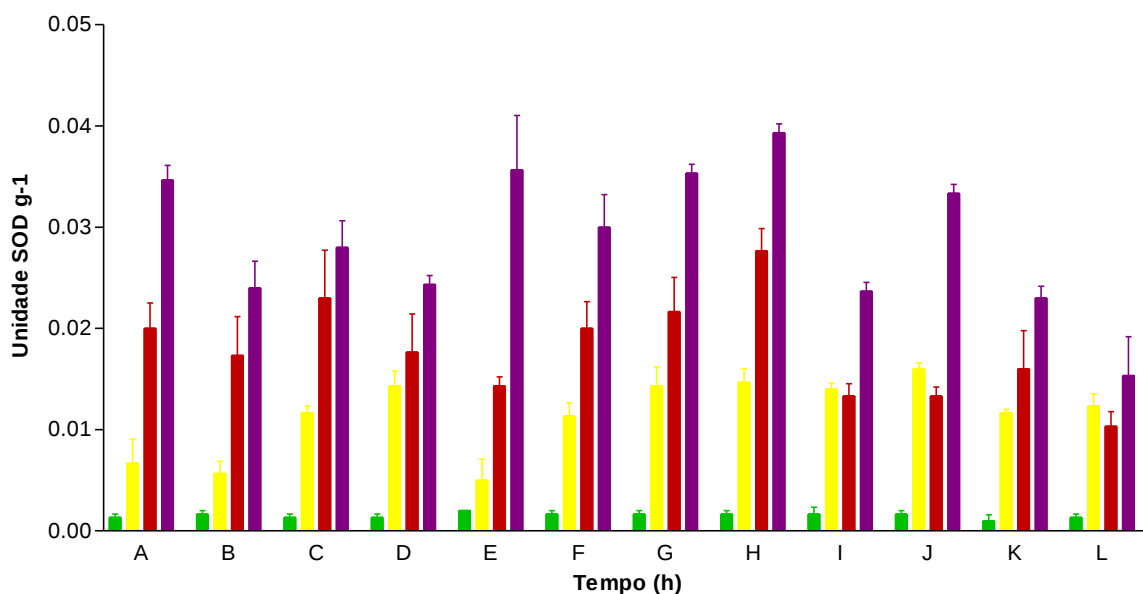


Figura 9 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) após diferentes tempos de indução e inoculação. Os tempos foram representados por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições. ■ Controle; ■ Inoculada com fosfato; ■ Inoculada com PMeV; ■ NO+PMeV.

5.1.2 Peroxidase (POD)

Quanto à atividade da enzima POD, foi usado o mesmo procedimento realizado para a análise da atividade da enzima SOD. Os resultados obtidos para a peroxidase demonstraram a ocorrência de diferenças entre os níveis desta enzima de plantas de mamoeiro tratadas com NO com os controles não tratados.

A análise destes resultados revelou que a atividade da POD em plantas pulverizadas com SNP foi superior a plantas pulverizadas com água, mostrando que, neste caso o NO é efetivo na indução de respostas de defesa.

Nas condições do experimento, observou-se um aumento da atividade da POD nas plantas do mamoeiro pulverizadas com SNP imediatamente após o tratamento, permanecendo constante durante o período de até 6 h. Este aumento foi significativo quando comparado com as plantas controle pulverizadas com água ou sem nenhum tratamento. Nos períodos subseqüentes, de 24, 48, 72 horas e 15 dias ocorreu um decréscimo na atividade, mas que ainda permaneceu elevada quando comparada aos controles. Após 30 dias de tratamento, a atividade da POD retornou aos níveis do controle (Figura 10).

Visando identificar a região da folha em que se concentrava a enzima POD ativa, folhas destas mesmas plantas foram analisadas quanto à formação de radicais de peróxido de hidrogênio. Desta forma, testes histoquímicos foram realizados e a análise foi efetuada por microscopia ótica.

Foram observadas grandes diferenças na intensidade de coloração, indicativas de diferenças nos níveis de atividade enzimática. Uma coloração marrom mais intensa e um espessamento de parede mostram a atividade desta enzima, principalmente no floema, compondo as fibras do floema (Figura 11 b, d, f, j, l).

Os resultados de microscopia ótica para as plantas tratadas com SNP foram bem representativos com relação à atividade enzimática da POD, ou seja, mais coloração mostrando maior geração de H_2O_2 , indicando diferenças nos níveis de atividade enzimática adsorvida na membrana. Esta relação se tornou ainda mais nítida no período de 30 min pós-tratamento, mostrando um pico na atividade da

enzima e uma visualização mais nítida na formação de peróxido de hidrogênio na região do floema e xilema da planta de mamoeiro tratada com SNP (Figura 11 f).

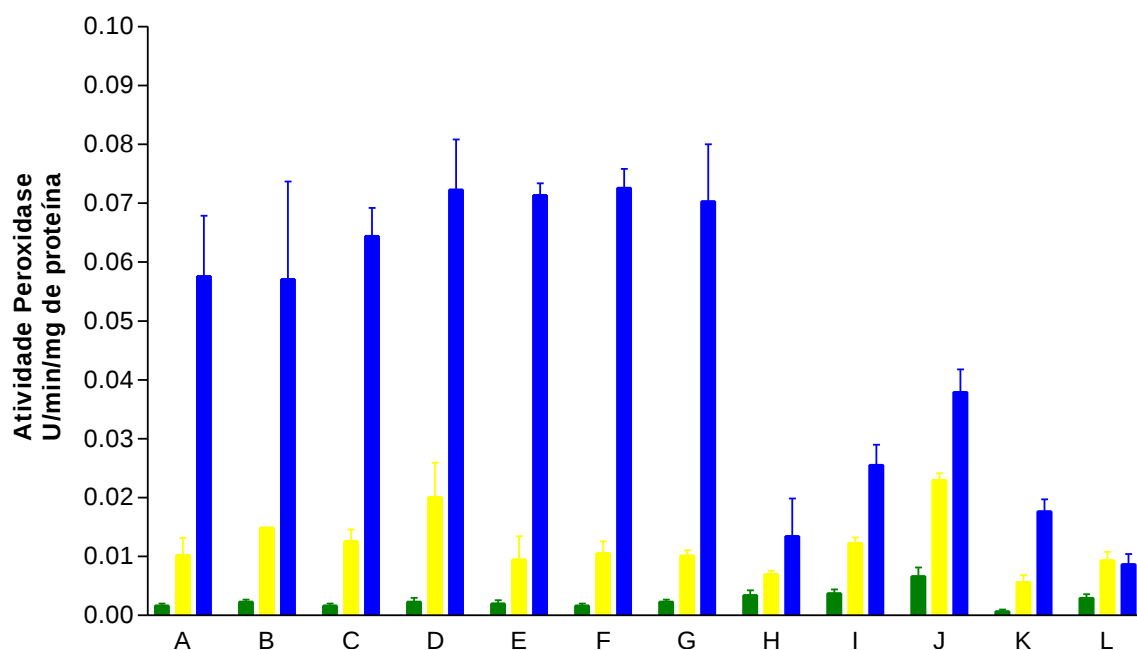
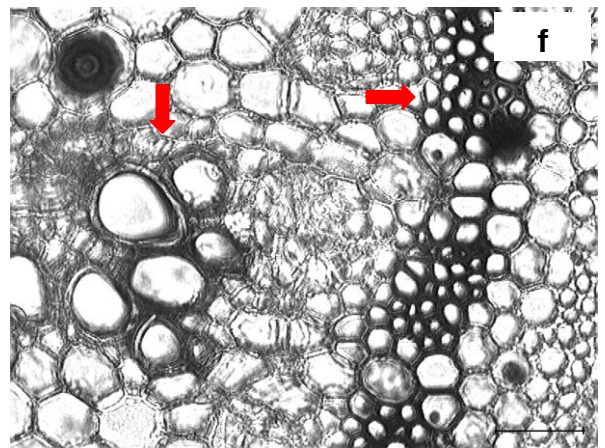
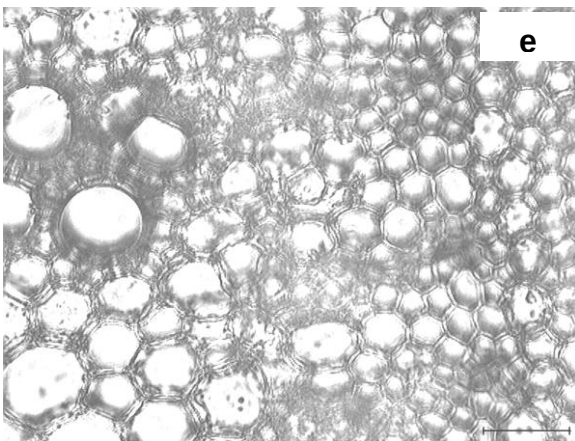
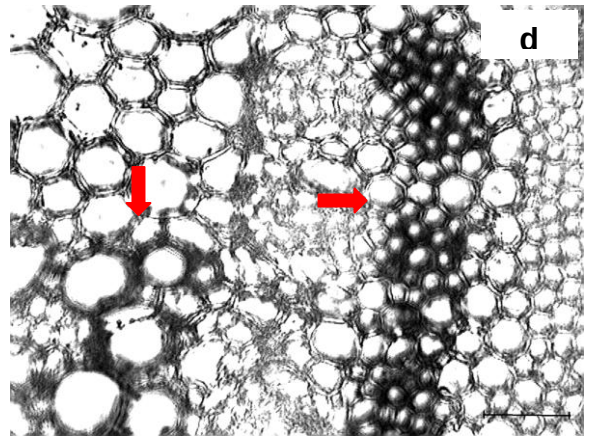
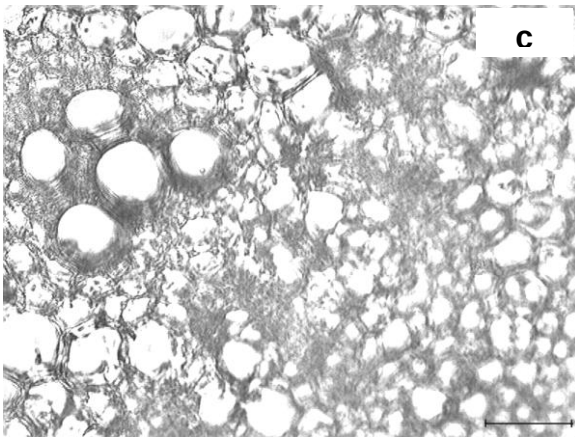
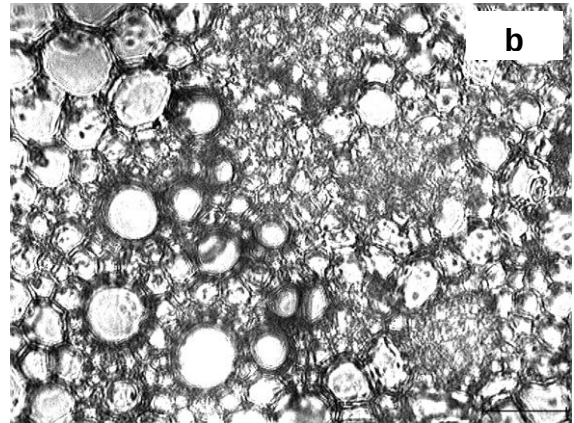
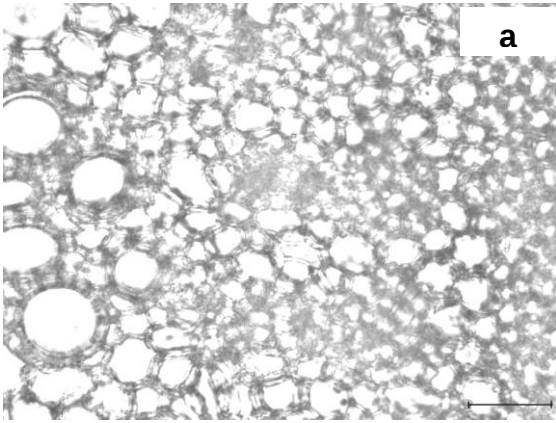
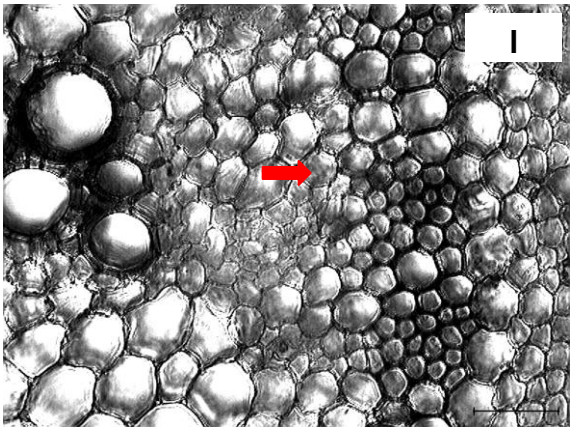
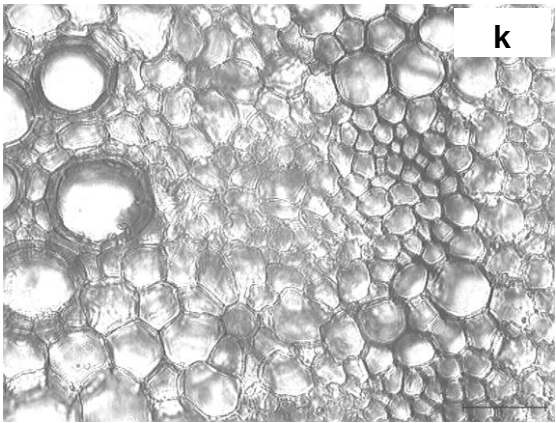
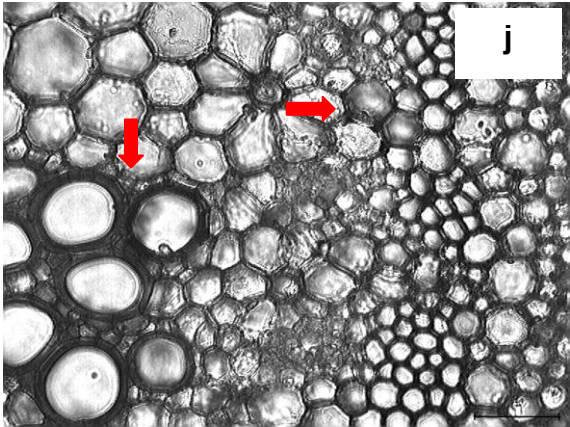
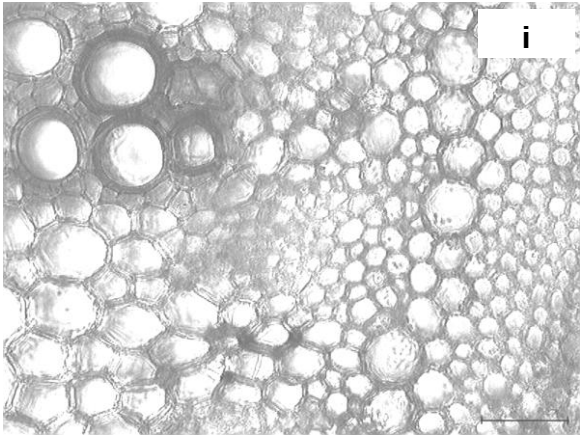
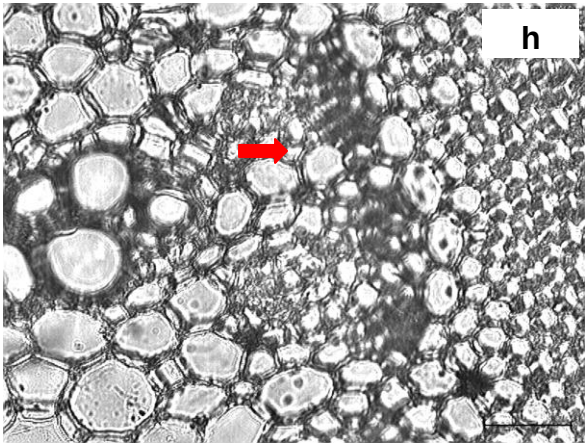
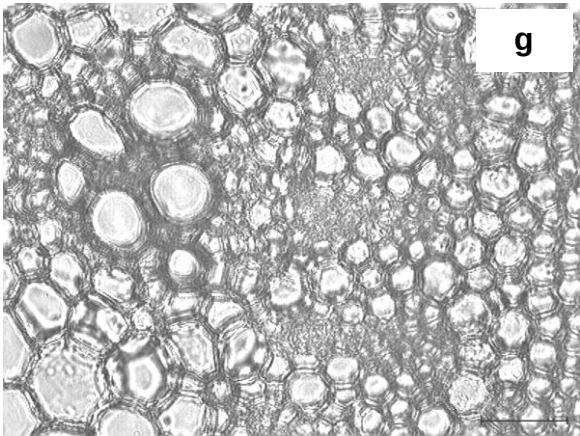


Figura 10 – Atividade da peroxidase (POD) após diferentes tempos de indução. Os tempos foram representado por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições. ■ Controle; ■ Tratada com água; ■ Tratada com NO.





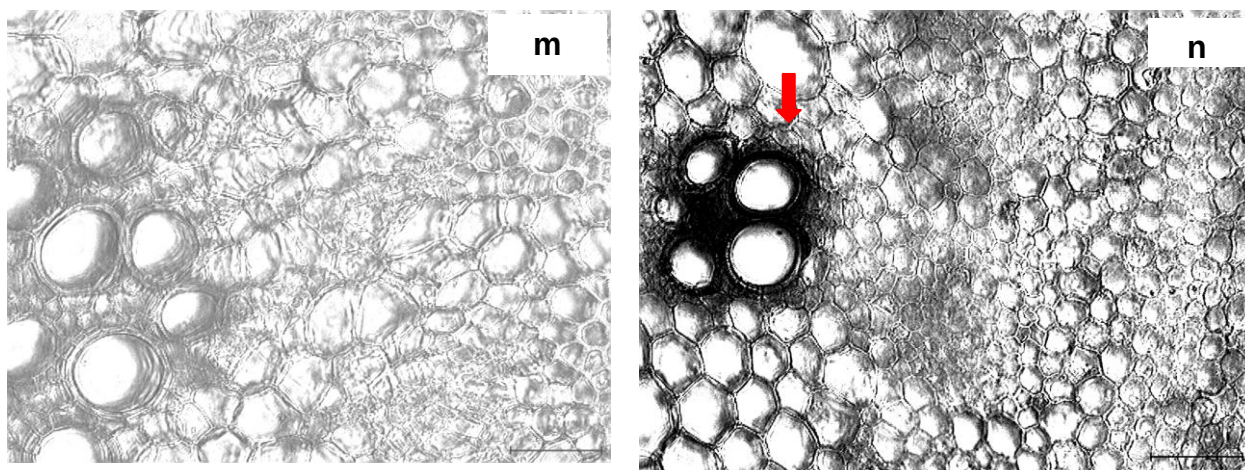


Figura 11 (a– n) Microscopia óptica de campo claro de cortes transversais do pecíolo de mamoeiro (cv. Golden). Após coloração com Azul nitro-tetrazol. As siglas a, c, e, g, i, k e m representam as plantas controle nos tempos 0, 15, 30, 45 min e 1, 3, 6, 24, 48, 72 h, 15 e 30 dias, respectivamente; enquanto b, d, f, h, j, l e n representam as plantas tratadas com NO nos mesmos tempos. Barra = 100 μ m.

O tratamento com NO, através da pulverização de mudas de mamoeiro com SNP, foi capaz de induzir a atividade da POD, passou-se, então, ao estudo deste sistema quando da planta inoculada com o vírus causador da doença da meleira do mamoeiro, PMeV.

Assim como discutido para as análises de SOD, para uma melhor análise da resposta de mudas de mamoeiro pulverizadas com SNP e inoculada concomitantemente com PMeV, foi introduzido um novo controle, somente da inoculação de tampão fosfato, visando descartar o efeito da injúria feita pela agulha na planta.

Observou-se um aumento na atividade da POD, em todos os tempos analisados, quando concomitante tratamento com NO e inoculação PMeV. Entretanto as plantas controles também apresentaram um estímulo desencadeado pelo NO, demonstrado pelo aumento da atividade da POD (figura 12).

A análise destes resultados revelou que imediatamente após o tratamento, ou seja, no tempo 0h, não houve aumento da atividade da enzima POD nas plantas de mamoeiro inoculadas com PMeV e nas plantas pulverizadas com SNP e

concomitantemente inoculadas com PMeV. Entretanto, após 15 minutos após o tratamento observou-se aumento significativo na atividade desta enzima nas plantas tratadas com SNP e inoculadas concomitantemente com PMeV. (Figura 12). Ocorreu um decréscimo no período de 30 min, ocorrendo um aumento significativo nos períodos de 6, 24, 48 e 72 horas.

A partir do 15º dia não houve diferença significativa na atividade da peroxidase para plantas inoculadas com PMeV e plantas pulverizadas com SNP e inoculadas com PMeV. (Figura 12).

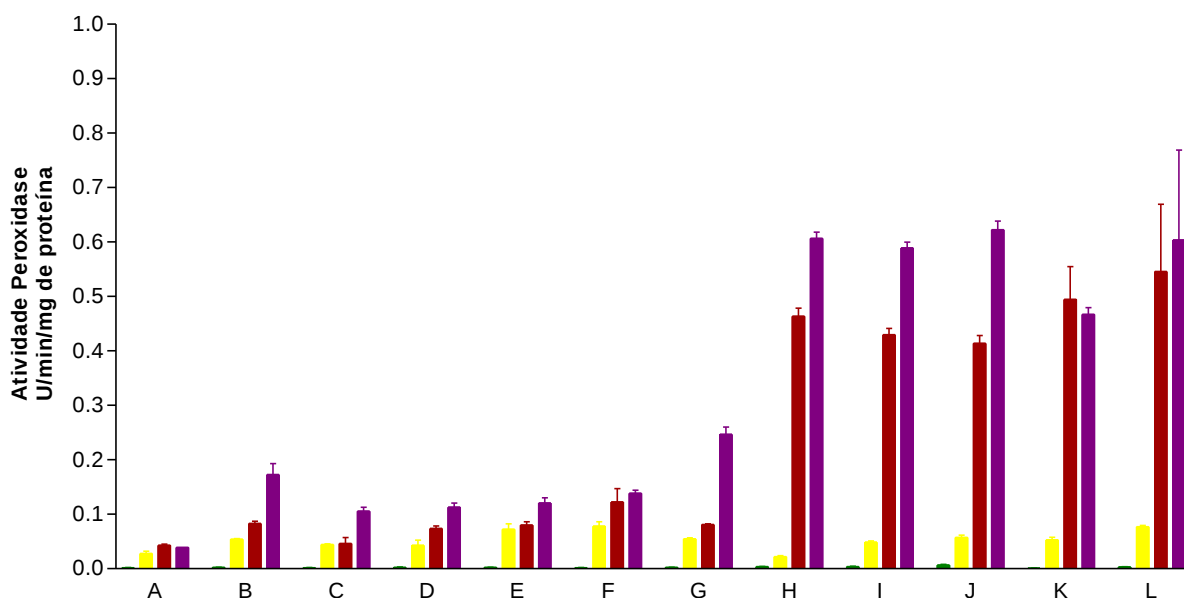


Figura 12 – Atividade da peroxidase (POD) após diferentes tempos de indução e inoculação. Os tempos foram representados por letras, (A) 0; (B) 15 min; (C) 30 min; (D) 45 min; (E) 1 h; (F) 3 h; (G) 6 h; (H) 24 h; (I) 48 h; (J) 72 h; (K) 15 dias; (L) 30 dias. As barras de erro representam o desvio padrão de três repetições. ■ Controle; ■ Inoculada com fosfato; ■ Inoculada com PMeV; ■ NO+PMeV.

6 DISCUSSÃO

O óxido nítrico induz a formação de espécies reativas de oxigênio, entre elas o radical superóxido, peróxido de hidrogênio, levando ao estresse oxidativo nas plantas. Na tentativa de eliminação dos radicais superóxido formados por condições de adversidades ambientais, as plantas apresentam mecanismos de defesa, através do aumento da atividade da SOD e POD correlacionando-se ao aumento da tolerância ao estresse (SCANDALIOS, 1993).

Podemos constatar neste trabalho que o NO pode ser considerado um indutor do sistema de defesa do mamoeiro, já que foram usados os mesmos procedimentos para todos os tratamentos, tanto para as plantas tratadas com água quanto para tratadas com SNP, mostrando que a resposta da planta não foi devido apenas ao contato das gotículas na planta, e sim o efeito do SNP como indutor de resistência na planta.

Essa resposta do NO à pulverização com SNP foi vista em todos os tempos analisados, mostrando a efetividade do NO nas plantas de mamoeiro. Esse estímulo desencadeado pelo SNP na indução da atividade da superóxido dismutase e peroxidase deve estar relacionado com o estresse oxidativo, pois a fim de combatê-lo, as plantas desenvolvem defesas, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes.

Diversos trabalhos mostram correlações entre resistência de plantas a estresse oxidativo e atividade da SOD e POD. A SOD tem sido extensivamente investigada por sua atividade ser induzida sob condições de estresse oxidativo, como uma resposta para metabolizar os radicais superóxido produzidos. Como exemplo, Okamoto *et al.* (1996) verificaram um aumento da atividade da SOD na alga *Tetraselmis gracilis* exposta a cádmio. Barreto (2005) observou em seu trabalho que as enzimas POX, GLU, SOD, CAT e PAL estão envolvidas com os mecanismos de resistência do feijão-caupi contra o fungo *Colletrochium lindemuthianum*.

Ruiz-Lozano *et al.* (1996) observaram que a atividade específica de SOD em plantas de alface (*Lactuca sativa*) colonizadas com *Glomus mosseae* e *Glomus*

deserticola e sujeitas a estresse hídrico foi maior em relação aos controles não micorrizados, concluindo-se que a indução de SODs em plantas micorrizadas estaria relacionada aos mecanismos de defesa da planta, em resposta ao estresse hídrico. Assim, esta enzima pode exercer um papel importante na defesa das plantas de mamão contra o estresse oxidativo induzido por doador de NO.

Mas nem sempre, esse aumento das atividades enzimáticas está relacionado à resposta de defesa, pois Dalisay e Kuc (1995 a, 1995 b) demonstraram que plantas de tomate transformadas com o gene de uma peroxidase de pepino, mesmo com o aumento da expressão de peroxidases não se tornaram resistentes a patógenos.

A outra enzima avaliada a peroxidase, teve sua atividade aumentada na planta tratada com SNP, que está envolvida na fase final da lignificação de parede (BOUDET *et al.*, 1995). A lignina é um polímero de fenólicos aromáticos que pode ser formado em resposta a ferimentos e ao ataque de patógenos (BOUDET *et al.*, 1995). Há uma forte evidência de que a lignificação é um importante mecanismo na resistência a doenças. Tem sido observado o aumento dos níveis da lignina em muitas espécies de plantas, a partir de infecções causadas por organismos patogênicos, tais como, fungos, bactérias, vírus e nematódeos (STICHER *et al.*, 1997).

O reconhecimento rápido de patógenos invasores pelas células vegetais e a indução rápida das respostas de defesa são essenciais para a resistência das plantas. Desta forma, a resistência ocorre quando respostas múltiplas de defesa são ativadas rapidamente e coordenadamente (YAMAMIZO *et al.*, 2006).

A avaliação da atividade SOD em plantas inoculadas com PMeV comparadas às plantas inoculadas e concomitantemente pulverizadas com SNP, mostrou uma tendência de aumento da atividade desta enzima no segundo caso, embora as diferenças não atinjam o nível de significância, provavelmente em função da alta carga viral. Estes dados mostram que a atividade da SOD é relativamente pouco afetada pela infecção viral nas condições do experimento, realizado em plantas mantidas em casa de vegetação. Esta enzima controla a quantidade de espécies reativas de oxigênio. Sabe-se que, em plantas que desenvolvem a reação de

hipersensibilidade (RH), a quantidade de espécies reativas de oxigênio aumenta bruscamente (“estresse oxidativo”) durante a formação da lesão e o isolamento do patógeno (VENISSE *et al.*, 2001). Mas como as plantas estudadas estavam com infecção sistêmica, estes mecanismos estavam sendo utilizados, não havendo, portanto, alteração na atividade da SOD.

Já a avaliação da atividade da POD logo após as plantas serem concomitantemente pulverizadas com SNP e inoculadas com PMeV comparada com as que foram inoculadas com PMeV, observou-se que ambas aumentaram a atividade de POD, sendo este aumento mais evidente para as plantas pulverizadas com SNP e inoculadas com PMeV. No entanto, este aumento na atividade enzimática não é suficiente para se afirmar que houve ativação dos mecanismos de defesa da planta, já que não houve diferença significativa nos tratamentos após o período de 15 e 30 dias.

A atividade da peroxidase pode estar relacionada à resposta de defesa das plantas, sendo esta uma enzima chave na expressão de resistência para muitas interações patógeno-hospedeiro (LEHERE, 1969). Essa enzima atua na oxidação de compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção, atua também na síntese de lignina e na biossíntese do etileno (PUERTOS-ROMERO, 2004). Sua atividade pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade de diferentes hospedeiros na presença de diferentes patógenos (FLORS e NONELL, 2006). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram altos níveis da atividade de peroxidase em plantas pulverizadas com SNP e inoculadas com PMeV.

Normalmente estas enzimas atuam como indicadoras do início da evolução da resposta de resistência, do que como elementos destinados à exercer defesa (FLORS e NONELL, 2006). Embora as peroxidases não possam ser utilizadas como marcadores de resistência bioquímicos, pelo menos neste trabalho a alteração na sua atividade é um indício de metabolismo alterado.

Esta diferença nas atividades enzimáticas mostrou que a acumulação do superóxido e peróxido de hidrogênio durante a primeira fase do processo de infecção poderia ser um fator importante que determinasse a sensibilidade da

infecção da planta. Confirmaria os resultados obtidos por Hernandez *et al.* 2001 em cultivares de damasco em relação ao vírus da varíola da ameixa.

Em ambos os casos, a diferença da suscetibilidade é determinada principalmente por diferenças entre H_2O_2 que gera enzimas (SOD) e as enzimas H_2O_2 scavenger (CAT, POX). Consequentemente, H_2O_2 acumula nas plantas resistentes e pode ser um dos fatores que provocaram a resposta da defesa. Geralmente, a geração e a acumulação rápida de H_2O_2 na interação do patógeno da planta, é uma característica adiantada da resposta hipersensitiva.

Em nosso caso, e por causa das diferenças notáveis na virulência do patógeno, a acumulação de O_2^- e H_2O_2 pode ser atribuída a uma resposta hipersensitiva. Pode-se relacionar certamente a outras vias metabólicas para que O_2^- e H_2O_2 sejam usados como o intermediários metabólicos, porque a presença da superóxido dismutase e da peroxidase não é um fator limitante em plantas resistentes, ativa potencialmente a biossíntese da lignina fortalecendo a parede da célula.

Diretamente envolvida na transdução de sinal, a atividade enzimática também pode estar envolvida na indução de outros mecanismos de defesa e/ou patogênese ligados às proteínas, ou ela pode ser apenas mais um componente da resposta das plantas.

Outros trabalhos são necessários para definir o papel exato de O_2^- e H_2O_2 neste contexto. Eles serão de grande interesse para compreender a base bioquímica da resistência mecanismos envolvidos na interação do mamoeiro e o PMeV.

Para todos os parâmetros bioquímicos estudados no trabalho, não é possível observar as diferenças entre as plantas inoculadas com PMeV e as plantas inoculadas com PMeV e concomitantemente pulverizadas com PMeV. A resistência resposta parece ser essencialmente determinada pela capacidade de resposta da planta pulverizada pelo SNP e não pelo patógeno.

As pesquisas com a cultivar Golden estão crescendo devido à sua importância econômica, entretanto não existem muitas publicações envolvendo aspectos moleculares e bioquímicos, sendo assim destacamos a importância da

geração de hipóteses e formulação de questões que permanecem em aberto para futuras abordagens no avanço biotecnológico dessa cultura.

Estando os resultados em acordo com recentes estudos que comprovam a participação do NO em diversos processos fisiológicos nas plantas, inclusive no desenvolvimento e defesa contra ataque de patógenos.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- Embora existam controvérsias sobre a possível origem do NO nas plantas, esta molécula possui claramente uma ação elicitora em mudas de mamoeiro;
- O tratamento com NO foi capaz de induzir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio em mudas de mamoeiro da cv. Golden;
- No presente trabalho, avaliou-se a alteração quantitativa e qualitativa da superóxido dismutase e peroxidase. Visando estabelecer o envolvimento destas enzimas no mecanismo de resistência de plantas de mamão ao PMeV, é interessante avaliar o perfil eletroforético das diferentes isoenzimas de superóxido dismutase e peroxidase em plantas inoculadas com PMeV e plantas pulverizadas com SNP e inoculadas com PMeV, uma vez que diferentes isoformas provavelmente estejam relacionadas à diferentes funções.

8 REFERÊNCIAS

- ABELLES, F.B.; BILES, C.L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, v.95, p.269-273, 1991.
- ALAMILLO JM, GARCIA-OLMEDO F. Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arapdopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Journal**, v.25, p. 529-540, 2001.
- 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.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. **Physiological Plantarum**, v.85, p. 235-241, 1992.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFESA VEGETAL. DEFESA VEGETAL. 9, 2006, São Paulo.
- ARAÚJO, M.M.M.d.; TAVARES, E.T.; SILVA, R.F.d.; MARINHO, V.L.d.A.; SOUZA, M.T.J. Molecular detection of *Papaya meleira vírus* in the látex of *Carica papaya* by RT-PCR. **J.Virol.Methods**, Issues 1-2, n. 146, p. 305-310, 2007.
- 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, cap 3. p. 81-119. 1999.
- BARRETO, A. L. H. Estratégias de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. & Magnus) Briosi & Cav.)] e *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta. 2005, 297 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- BARROSO, J.B., CORPAS, F.J., CARRERAS, A., SANDALIO, L.M., VALDERRAMA, R., PALMA, J.M., LUPIÁÑEZ, J.A., DEL RÍO, L.A. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. **J. Biol. Chem.** V. 274, p. 36729–36733. 1999.
- BARZ, W.; KOSTER, J. Turn over and degradation of secondry (natural) products. In: Con,E.E.; STUMPF, P.K. (Org.). The biochemistry of plants: a comprehensive tretise. New York: **Academic Press**, p.457-479. 1981.
- BETHKE, P.C., BADGER, M.R., JONES, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, v.16, p. 332-341. 2004.
- BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p. 99-109, 1999.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina** (Buenos Aires), v. 58, p. 350-356, 1998.

BOWLER C, VAN MONTAGU M AND INZÉ D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v.43, p. 83-116. 1992.

BRAY, E.A., BAILEY-SERRES, J. & WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (B.B. Buchanan, W. Gruissen, & R.L. Jones, eds.). **American Society of Plant Physiologists**, New York, p.1158-1203. 2000.

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. & JONES, R.L. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, Courier Co, Inc, 1a ed, Waldorf. CD-ROM

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.

CARRERAS, M.C.; PARGAMENT, G. A.; CATZ, S. D., PODEROSO, J. J., BOVERIS, A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during respiratory burst of human neutrophils. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 341, n.1, p.65, 1994.

CHANDOK, M.R., YETTERBERG, A.J., VAN WIJK, K.J., KLESSIG, D.F. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. **Cell**, v.113, p. 469-482. 2003.

COONEY, R.V., HARWOOD, P.J., CUSTER, L.J., FRANKE, A.A. Light-mediated conversion of nitrogen-dioxide to nitric-oxide by carotenoids. **Environ. Health Perspectives**, v. 102, p. 460-462. 1994.

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

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, 1995b.

DELLEDONNE M. NO news is good news for plants. **Current Opinion in Plant Biology** v. 8, p. 1-7. 2005.

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

DIAZ, J., SERRANO, E., ACOSTA, F., CARBONELL, L.F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

DI PIERO, R.M.; KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Indução de resistência e a produtividade das culturas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos, Piracicaba: FEALQ. p. 239 – 255. 2005.

DURRANT, W.E., DONG, X. Systemic Acquired Resistance. **Annual. Review Phytopathologist**, v. 42, p.185-209. 2004.

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.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FODOR, J., A. JOZSA, AND KIRALY, Z. Systemic acquired disease resistance in plants. **Novenyvedelem**, v. 34, p. 117-126. 1998.

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.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity of *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v.32, p. 653 – 669, 1942.

FLORS C, NONELL S. Light and Singlet Oxygen in Plant Defense Against Pathogens: Phototoxic Phenalenone Phytoalexins. **Acc. Chem. Res.**, 39 (5), 293 - 300, 2006.

FORMAN, H.J.; THOMAS, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 669-680, 1986.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOLOUS, H., LEE, V. M. Y.; TROJANOWSKI, J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 32, n. 12, p. 1264-1275, 2002.

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.

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.

GUO, F-Q., OKAMOTO, M., CRAWFORD, N.M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. **Science**, v. 302, p. 100-103. 2003.

HE, Y.K., TANG, R-H., HAO, Y., STEVENS, R.D., COOK, C.W., AHN, S.M., JING, L.F., YANG, Z-G., CHEN, L-G., GUO, F-Q, FIORANI, F., JACKSON, R.B., CRAWFORD, N.M., PEI, Z.M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. **Science**, v. 305, 1968-1971. 2004.

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

HUANG X, STETTMAIER K, MICHEL C, HUTZLER P, MUELLER MJ, DURNER J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 218, p. 938-946. 2004.

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

JABS T., DIETRICH R.A. & DANGL J.L. Extracellular superoxide is necessary and sufficient for runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant. **Plant Physiology** v.111, p. 1357–1371. 1996.

JONES A. Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? **Trends in Plant Science Perspectives**, v. 5. n.5 p. 225-230, 2000.

KITAJIMA, E.W., RODRÍGUEZ, C.H., SILVEIRA, J.A., ALVES, F.L., VENTURA, J.A., ARAGÃO, F.J.L., OLIVEIRA, L.H.R. Association of isometric particles, restricted to laticifers, with meleira (sticky disease) of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatol. Brás**, v. 18, p. 118-122, 1993.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; DEL ÁGUILA, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v.27, n.1, p.13-20, 2006.

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**, p.105-135. 2000.

LUCS, J. A. Plant immunisation: from myth to SAR. **Pesticide Science**, v. 55, p. 193-196, 1999.

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.

MAGALHAES, J.R., MONTE, D.C, DURZAN, D. Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. **Physiol. Mol. Biol. Plants** 6, 117-127. 2000.

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

MARTINS, D. DOS S. Situação atual da produção integrada do mamão no Brasil. In: MARTINS D DOS S. (ed). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. 2003. p.97-130.

MARTINS, D. DOS S. União de esforços pelo mamão brasileiro. **Defesa Vegetal**, p.23-27. 2006.

MEDEIROS, R. B.; MARISA A. S.; VELLOSO, F.; DIANESE, J. C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. Brasília: **Editora Universidade de Brasília**, 209p. 2003.

MODOLO, L.V., CUNHA, F.Q., BRAGA, M.R., SALGADO, I. Nitric oxide synthasemediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. **Plant Physiol**, v. 130, p. 1288-1297. 2002.

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

OGALLO, J. L.; MCCLURE, M. A. Systemic acquired resistance and susceptibility to root-knot nematodes in tomato. **Phytopathology**, v. 86, p.498-501, 1996.

OGA, Z. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 39-44, 2003.

OROZCO-CARDENAS M. L, RYAN C. A. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. **Plant Physiol**, v. 130: p. 487-493. 2002.

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**, v.1, cap.22. p. 417-453. 1995.

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.

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.

PRASAD, M.N.V.; RENGEL, Z. Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress. **Annual New York Academy of Science**, v.851, p.216-223, 1998.

PRATES, R.S. Aspectos operacionais do programa de exportação do mamão brasileiro para os Estados Unidos: sete anos de sucesso. In: MARTINS D. Dos S. (ed.). Papaya Brasil: mercado e inovações tecnológicas para o mamão. Vitória, ES: INCAPER. 2005. p. 57-78.

PUERTO-ROMEROS CM, PERAZOLLI M, ZAGO ED, DELLEDONNE M. Nitric Oxide Signalling functions in Plant-Pathogens Interactions. **Cellular Microbiology**, 6(9), 795-803, 2004.

RAY, H.; HAMMERSCHMIDT, R. Response of potato tuber to infection by *Fusarium sambucinum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.53, p. 81-92, 1998.

REZENDE, M. L. V., SALGADO, S. M. L. & CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130. 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. Oligossacharide elicitors: structure and recognition. In: International conference of European foundation for Plant Pathology. Strasbourg, 1993. proceedings. **Dordrecht: Kluwer Academic**, p.121-135. 1993.

RIVERO, R.M., RUIZ, J.M. & ROMERO, L. Oxidative metabolism in tomato plants subjected to heat stress. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 79, p. 560-564. 2004.

RODRIGUES, S.P., VENTURA, J.A., ANDRADE, J. S., GALVÃO, O. P., FERNANDES, P. M. B. Método Molecular Simplificado para o Diagnóstico da Meleira do Mamoeiro em Látex e Tecidos de Plantas Infectadas. **Summa Phytopathologica**, p. 273-275, Brasil, 2005a.

RODRIGUES, S.P., LINDSEY, G., FERNANDES, P.M.B. Biotechnological Approaches to the Control of Plant Viruses. In: THANGADURAI, D. (Org.). **Plant Stress and Biotechnology**. Tamil Nadu, 2006.

RODRIGUES, S.P., DA CUNHA, M., VENTURA, J.A., FERNANDES, P.M.B. Análise Histoquímica e Estrutural de Compostos Presentes no Látex de Plantas com Meleira e sua Relação com o PMeV. In: **Papaya Brasil: Mercado e Inovações Tecnológicas para o Mamão**, 430-433, BR, 2005b.

ROMERO-PUERTAS MC, PERAZZOLLI M, ZAGO E, DELLEDONNE M. Nitric oxide signalling functions in plant pathogen interaction. **Cell Microbiol**, v. 6, p. 795-803. 2004.

SALGADO I, MODOLO LV, RIBEIRO JN, MAGALHÃES JR, TAMASHIRO WMSC. Parallels between plants and animals in the production and molecular targets of nitric oxide. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 8, n.2, p. 185-191, 2002.

SANTORO, N., THIELE, D.J. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Yeast Stress Responses. Ed. S. Hohmann and W. H. Mager. [Heidelberg: Springer-Verlag GmbH & Co. KG], p. 171-212, 1999.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, n.1, p.7-12, 1993.

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

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.M.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235-270. 1997.

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

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 LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M. & PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36: 453-483, 1998.

VENTURA, J.A., COSTA, H., TATAGIBA, J.S. Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o “rouging”. *Fitopatol. Brás*, v. 26, p. 536, 2001.

VENTURA, J.A., COSTA, H., TATAGIBA, J.S., ANDRADE, J.S. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomatologia e controle. In: Martins D. dos S. (ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória, ES: INCAPER. 2003. p. 267-276.

ZAMBOLIM, E.M., ALONSO, S.K., MATSUOKA, K., CARVALHO, M.G., ZERBINI, F.M. Purification and partial characterization of papaya meleira virus, a novel virus infecting papaya in Brazil. **Plant Pathol**, v. 52, p. 389-394. 2003.

ZEIDLER, D., ZÄHRINGER, U., GERBER, I., DUBERY, I., HARTUNG, T., BORS, W., HUTZLER, P. DURNER, J. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 15811-15816. 2004.