

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



ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM
Theobroma cacao L. INDUZIDO POR *Crinipellis pernicioso*
(Stahel) Singer

GERUZA DE OLIVEIRA CEITA

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
Agosto de 2004

GERUZA DE OLIVEIRA CEITA

**ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM *Theobroma cacao* L.
INDUZIDO POR *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer**

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

**ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
Agosto de 2004**

GERUZA DE OLIVEIRA CEITA

**ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM *Theobroma cacao* L.
INDUZIDO POR *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer**

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

APROVADA: 18 de agosto de 2004

Prof.^a. Dr.^a. Karina Peres Gramacho
CEPLAC

Prof. Dr. Gonçalo Guimarães Pereira
UNICAMP

Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo
(Orientador) UESC

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos
por me cercarem sempre com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Mestrado em Genética Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do curso e incentivo.

Ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) da Comissão Executiva da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) pela permissão da execução de parte do trabalho em suas dependências.

Ao professor Dr. Júlio César de Mattos Cascardo, pela oportunidade, orientação e confiança.

À professora Dr^a. Ana Lúcia Pires Cotias de Oliveira, pela minha iniciação científica.

Aos professores do Mestrado em Genética e Biologia Molecular da UESC, pelos ensinamentos.

À Dr^a Karina Peres Gramacho, pelas grandes sugestões, oportuna ajuda e pelo fornecimento e inoculação do material vegetal.

Às professoras Dr^a Delmira Costa e Dr^a Lise Labejof, pela grande colaboração e auxílio.

A Adriana Leal, Alfredo Dantas, Bianca Mendes, Cristiane Lopes, Jeiza Leal, Joci Macedo, Lívia Lessa, Patrícia Caldas, Ronaldo Carvalho, Stênio Carvalho e Maíza Lopes, queridos amigos do curso, pelos bons e inesquecíveis momentos.

A Robson, Pelé e Jaci, pelo agradável convívio e alegria sempre presente.

Aos doutores Andréa Mariano, Fabienne Micheli, Priminho Pirovani e Abelmon Gesteira, pelas sugestões e colaboração no trabalho.

A Thais, Aline, Balbiane, Lívia, Edilson, Raul e demais colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UESC, pelo auxílio e pelos bons momentos que compartilhamos. E finalmente, a todos que tiveram ao menos uma mínima parcela de contribuição nessa etapa tão desejada da minha vida.

ÍNDICE

	Página
EXTRATO.....	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1 <i>Theobroma cacao</i> x <i>Crinipellis pernicioso</i>	04
2.2 Interação planta–patógeno.....	07
2.2.1 Infecção de fungos em plantas.....	07
2.2.2 Elicitores.....	09
2.2.3 Mensageiros secundários.....	12
2.3 Morte celular programada.....	13
2.3.1 Histórico.....	13
2.3.2 Morte celular durante o desenvolvimento.....	14
2.3.3 Morte celular desencadeada por estímulos bióticos e abióticos.....	16
2.3.4 Caracterização do processo de morte celular programa- da.....	18
2.3.4.1 Sinalização durante o processo de morte celular.....	18
2.3.4.2 Genes envolvidos em apoptose.....	23
2.3.5 Técnicas utilizadas para detecção de morte celular	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Material vegetal.....	29
3.2 Inoculação	29
3.3 Coleta das amostras	30
3.4 Extração de DNA e eletroforese	31

3.5	Análises de TUNEL	32
3.5.1	Desidratação e inclusão em parafina.....	32
3.5.2	Emblocamento e corte.....	32
3.5.3	Desparafinação e rehidratação.....	33
3.5.4	Permeabilização e detecção da fragmentação do DNA...33	
3.5.5	Análise em microscopia.....	34
3.6	Coloração convencional de material botânico.....	34
3.7	Ensaio da tolerância de <i>Crinipellis pernicioso</i> a doses crescentes de peróxido de hidrogênio <i>in vitro</i>	35
3.8	Análise do perfil de expressão de genes envolvidos em PCD na biblioteca da interação compatível Cacau x <i>Crinipellis pernicioso</i> ...35	
4.	RESULTADOS.....	38
4.1	Avaliação dos sintomas da doença.....	38
4.2	Detecção de fragmentação do DNA pela técnica de TUNEL.....	40
4.3	Análise de fragmentação do DNA em gel de agarose.....	42
4.4	Detecção de cristais de Oxalato de Cálcio e deposição de compostos fenólicos.....	42
4.5	Análise dos efeitos do H ₂ O ₂ sobre o crescimento micelial de <i>C.pernicioso</i>	46
4.6	Análise do perfil de expressão da biblioteca da interação compatível Cacau x <i>Crinipellis pernicioso</i>	50
5.	DISCUSSÃO.....	51
5.1.	Fragmentação do DNA em <i>T. cacao</i> induzida por <i>C. pernicioso</i>	51
5.2.	Células de cacau em processo de PCD acumulam cristais de oxalato de cálcio : possível envolvimento nos processos de morte celular.....	53
5.3	<i>Crinipellis pernicioso</i> tolera ambientes altamente oxidativos	59
6.	CONCLUSÕES.....	63
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

EXTRATO

CEITA, Geruza de Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, agosto de 2004. **Análise do processo de morte celular em *Theobroma cacao* L. induzido por *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer.** Orientador: Júlio César de Mattos Cascardo, Co-orientador(a): Fabienne Florence Lucienne Micheli. Colaborador (a): Delmira da Costa e Silva.

O desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa*, tem provocado inúmeros danos econômicos e sociais à região Sul da Bahia. Durante a infecção, o cacaueiro apresenta uma sintomatologia característica de morte celular, culminando com uma seca nos ramos. A morte celular programada (Programmed cell death-PCD) é um processo geneticamente controlado essencial para o desenvolvimento e crescimento de organismos multicelulares. Em plantas, este evento é ativado durante muitas etapas do desenvolvimento desde reprodução até a senescência. PCD é também desencadeado em resposta a muitas alterações ambientais, presença de toxinas e em resposta ao ataque de patógenos. Durante a infecção, as plantas são capazes de liberar uma série de compostos visando impedir a dispersão do patógeno, este evento é freqüentemente acompanhado por um processo de morte celular ao redor do sítio de infecção, conhecido como Resposta de Hipersensibilidade. Embora, certos patógenos tenham evoluído mecanismos que os capacita a penetrar nestas barreiras.

Células animais e vegetais em processo de morte celular apresentam traços característicos tais como fragmentação do DNA, condensação nuclear e formação de corpos apoptóticos. Este estudo visou analisar indicadores de alterações celulares característicos de PCD no patossistema *Crinipellis pernicioso* x *Theobroma cacao*. Com esta finalidade, plântulas de cacau da variedade susceptível catongo foram inoculadas com esporos de *C. pernicioso*, coletadas e analisadas. A análise da fragmentação do DNA foi proferida por meio de técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling), utilizando a metodologia sugerida por Gavrielli, 1992 com modificações. A aparência e a intensidade da fluorescência foram indicativas da fragmentação nuclear, assim como a degradação do DNA em tecidos de cacaueiro em avançado estágio de infecção. Em células de *T. cacao* infectadas por *C. pernicioso* foi observado acúmulo de cristais de Oxalato de Cálcio, possivelmente devido ao influxo de Cálcio intracelular. *Crinipellis pernicioso* também mostrou-se capaz de sobreviver em ambientes oxidativos. A análise do perfil de expressão dos genes da biblioteca da interação compatível Cacau x *Crinipellis pernicioso* confeccionada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz permitiu a identificação de genes relacionados ao processo de PCD. O basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* é capaz de desencadear morte celular durante seu processo infeccioso em *Theobroma cacao*, sendo que os sintomas são acentuados em estágios avançados de infecção.

Palavras chave: *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, vassoura-de-bruxa, morte celular .

ABSTRACT

CEITA, Geruza de Oliveira, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilheus, August 2004. **Analysis of programmed cell death in *Theobroma cacao* L. triggered by *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer.** Advisor: Júlio César de Mattos Cascardo. Advisor Committee Members: Fabienne Florence Lucienne Micheli and Delmira da Costa e Silva.

Programmed cell death (PCD) is an inherent part of the life cycle of a multitude of multi-cellular organisms, including animals and plants. The PCD is a process genetically controlled, associated with biochemical and morphological changes in the host and is better understood in animals. In plants, this event is related to senescence, tracheal elements development and pathogen responses. The spread of the Witches' broom disease, caused by the fungus *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer, is causing several economic, environmental and social damages to the South region of Bahia. During the infection, the cocoa plant exhibits a characteristic PCD sintomatology. This study aimed to characterize the event of tissue degradation in *Theobroma cacao* triggered by *Crinipellis pernicios*. A DNA fragmentation, typical symptom of cells suffering apoptosis, could be observed by TUNEL analysis and agarose gel electrophoresis, with the DNA fragmentation increasing with the severity of the symptoms. Furthermore, *Crinipellis pernicios* showed to be capable to survive in highly oxidizing environments, suggesting that it is resistant to reactive oxygen species (ROS). Calcium oxalate crystals were found in diseased, but not in

healthy cells. This has been previously observed in animal cells under apoptosis. The response and death of *Theobroma cacao* to *Crinipellis pernicioso* infection and colonization can be characterized as a PCD triggered by the pathogen.

Keywords: *Theobroma cacao*, *Crinipellis pernicioso*, witches' broom, cell death.

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo de vida de <i>Crinipellis pernicioso</i>	6
2. Eventos de morte celular programada em plantas.....	17
3. Representação esquemática da técnica de TUNEL.....	28
4. Delineamento experimental de coleta.....	30
5. Sintomas da vassoura-de-bruxa em plântulas de <i>Theobroma cacao</i>	39
6. Análise de secções de tecido meristemático de <i>T. cacao</i> por meio da técnica de TUNEL.....	41
7. Análise da degradação do DNA do cacauero por gel de agarose durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa.....	43
8. Detecção de cristais de Oxalato de Cálcio (Drusas) em secções de tecido do cacauero.....	44
9. Formação de microvacúolos de compostos fenólicos.....	45
10. Visão detalhada de cristal de Oxalato de Cálcio.....	45

11. Visão detalhada de cristal de Oxalato de Cálcio e microvacuólos de compostos fenólicos	45
12. <i>Crinipellis pernicioso</i> 10 dias após crescimento em meio de cultura sólido, contendo concentrações crescentes de H ₂ O ₂	47
13. <i>Crinipellis pernicioso</i> 18 dias após crescimento em meio de cultura sólido, contendo concentrações crescentes de H ₂ O ₂	48
14. Efeito de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ sobre crescimento micelial de <i>Crinipellis pernicioso</i>	49
15. Reação enzimática de conversão do Oxalato.....	57
16. Metabolismo do glioxilato.....	62

LISTA DE TABELAS

1. Caracterização dos principais indutores de necrose já identificados.....11
2. Principais genes envolvidos no processo de morte celular.....26
3. Genes relacionados à morte celular programada identificados na biblioteca da interação compatível cacau x *Crinipellis pernicioso*..... 50

1. INTRODUÇÃO

A cacauicultura tem sofrido grandes danos devido à incidência de doenças que acomete suas plantações. Dentre os principais patógenos que levam ao desenvolvimento de doenças no cacauero, se destaca o fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, agente causador da vassoura de bruxa. A região Sul da Bahia, principal pólo da cacauicultura do Brasil, esteve livre da doença até o ano de 1989 e desde então tem sofrido grandes danos causados por esta enfermidade, levando a perdas significativas na produção (PEREIRA *et al*, 1989; PURDY & SCHIMIDT, 1996). A extensa área contínua cultivada com cacau, boa parte com cultivares tradicionais susceptíveis e a regularidade na distribuição de chuvas favorecendo os surtos de crescimento das plantas ao longo do ano são condições propícias para rápida disseminação do fungo na região (DIAS, 2001). Dessa forma, *Crinipellis pernicioso* vem causando danos de grandes dimensões às plantações, reduzindo significativamente o número de cultivares produtivos, o que tem levado a um grande prejuízo aos agricultores, ao meio ambiente e a sociedade de um modo geral.

Na medida que este fitopatógeno tem causado inúmeros prejuízos à sociedade, medidas profiláticas como: remoção e destruição de partes infectadas, controle químico (fungicidas) e melhoramento genético convencional têm sido efetuadas visando reverter este quadro. Diante das restrições apresentadas por essas medidas, estudos em nível de Biologia Molecular surgem como ferramentas poderosas na investigação de mecanismos desencadeados nesta interação planta-patógeno. O estudo, a fundo, desse patossistema é de fundamental importância para compreensão de mecanismos utilizados pelo fungo no processo de colonização, auxiliando no diagnóstico de possíveis alvos ou estratégias adequadas ao manejo da doença.

A chave para ativação do processo de infecção é o reconhecimento de moléculas estranhas às plantas (OKU, 1992). Fungos, assim como outros fitopatógenos, possuem alguns metabólitos presentes na superfície celular que atuam como sinais químicos na complexa rede de sinalização celular desencadeada em condições de infecção (KNOGGE, 1996). Conhecidos como elicitores, podem ser caracterizados como proteínas, pequenos peptídeos, glicoproteínas ou oligossacarídeos produzidos pelo patógeno e possivelmente desencadear mecanismos de reconhecimento e respostas de defesa no hospedeiro (MONTESANO *et al.*, 2003).

Elicitores fúngicos podem vir a desencadear o processo de morte celular programada (Programed cell death - PCD). Este evento é um mecanismo molecular utilizado em vários processos de desenvolvimento celular e necessário ao crescimento regular de organismos multicelulares. Em plantas, os sistemas modelo mais bem caracterizados são o processo de senescência, a formação de elementos traqueais e a resposta de hipersensibilidade, que é freqüentemente observada em interações planta-patógeno (DANGL *et al.*, 2000). Algumas características chave têm sido identificadas em processos de PCD, tais como fragmentação do DNA, liberação de espécies Oxigênio Reativas (ROS), acúmulo de fitoalexinas e compostos fenólicos, depósito de calose, presença de óxido nítrico (NO), alteração no fluxo de Ca^{+2} e outros íons, liberação do citocromo c mitocondrial e liberação de fitohormônios (Etileno, Ácido Jasmônico e Ácido Salicílico) (MITTLER, 1998). Salientando-se que diferentes fenótipos são observados a depender do patossistema em questão.

A sintomatologia desenvolvida pelo cacauero durante a infecção por *Crinipellis perniciosa* possui características bem definidas, sendo que a degeneração do tecido da planta tem sido descrita como um dos principais sintomas desta interação (SILVA *et al.*, 2002).

Analisando-se uma biblioteca de cDNA obtida a partir de mRNA de uma interação compatível de uma variedade susceptível de Cacau (catongo) inoculada com esporos de *Crinipellis perniciosa*, confeccionada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz, foi identificada uma *open reading frame* (ORF) de 693 pb que apresenta similaridade com seqüências de genes indutores de necrose de outros patógenos (*Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora sojae*,

Phytophthora parasitica, *Bacillus halodurans* e *Fusarium oxysporum*) depositadas em banco de dados (NCBI). A proteína que é codificada por este gene é responsável pela indução de morte celular em outros patossistemas.

Os estudos hoje existentes relacionados a estes indutores são escassos quanto à caracterização do processo de morte celular. Em função disso, este trabalho teve como objetivo caracterizar o processo de degeneração tecidual do cacaueteiro observado em resposta a infecção por *Crinipellis pernicioso*, analisando possíveis indicadores de alterações celulares característicos de morte celular programada induzida por patógenos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Theobroma cacao* x *Crinipellis perniciosa*

O gênero *Theobroma*, possuindo 22 espécies, se destaca pela diversidade dentro da família *Sterculiaceae*. Todas as espécies de *Theobroma* possuem valor comercial, sendo que *T. cacao* é a única cujo cultivo alcança grande expressão, por conta da exploração em larga escala. Trata-se de uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical e nativa da região de floresta úmida do continente americano, onde vegeta no sub-bosque (POUND, 1938).

O cacau é um cultivo de relevância por possuir valor industrial e alimentício. A sua importância econômica é traduzida pelo consumo de chocolate sob as mais variadas formas por todo o mundo, também pela disseminação da utilização da manteiga de cacau, polpas, dentre outros produtos. O Brasil sempre se destacou na produção de cacau, chegando a ser considerado o principal país produtor das Américas no ano de 1994 (PURDY & SCHIMIDT, 1996). As doenças que acometem as suas plantações, porém, tem levado a redução da quantidade e qualidade do produto, além de elevarem os custos para os produtores.

Apesar da existência de outros patógenos, *Crinipellis perniciosa* se destaca como principal causador da redução da produtividade das plantações de cacau brasileiras. Este fitopatógeno é um importante basidiomiceto hemibiotrófico, destrutivo de colheitas na América do Sul Tropical, sendo comum na Amazônia Brasileira. Na Bahia, seu aparecimento se deu no ano de 1989, sendo identificados dois grupos distintos que diferiram dos isolados da Amazônia Brasileira (PEREIRA *et al*, 1989;

ANDEBRHAN *et al.*, 1999). O patógeno causador da Vassoura de Bruxa parece ter co-evoluído com *T. cacao* na Bacia Amazônica (WHEELER, 1985). Por uma desordem fisiológica, leva a uma hipertrofia e ao crescimento desordenado de brotos, os quais tomam o aspecto de vassoura. O fungo infecta frutos, tornando as sementes impróprias para o consumo e leva à perdas indiretas da produção por causar debilitação da árvore infectada. O patógeno se caracteriza como biotrófico na fase inicial de infecção e saprófito nos últimos estágios de colonização, esporulando em tecidos mortos. Seus basidiocarpos desenvolvem-se do micélio saprofítico dicariótico em vassouras secas (Figura 1). Os basidiósporos são dispersos pelo vento e chuva e são os únicos propágulos comprovadamente infectivos do patógeno, geminando na superfície da planta e produzindo tubos monocarióticos, que são atraídos para os estômatos ou espaços intercelulares onde penetram o hospedeiro (FRIAS, 1991; SILVA, 1997).

Os micélios biotróficos do patógeno estão presentes nas vassouras verdes. Algumas semanas após a infecção, no início da fase saprofítica, as folhas do hospedeiro começam a necrosar, e ocorre uma degradação pelo micélio saprofítico, provavelmente com o envolvimento de enzimas hidrolíticas (PURDY & SCHMIDT, 1996). É sabido que o micélio saprofítico é capaz de produzir uma série de enzimas extracelulares degradativas que criam ambiente adequado à sua sobrevivência (GRIFFITH *et al.*, 1994). Ocorre, portanto, uma transição de vassouras verdes para vassouras necróticas, sendo este um dos principais sintomas descritos na literatura (SILVA *et al.*, 2002). A troca do crescimento biotrófico para o saprofítico representa também uma troca da utilização de recursos biológicos pelo patógeno.

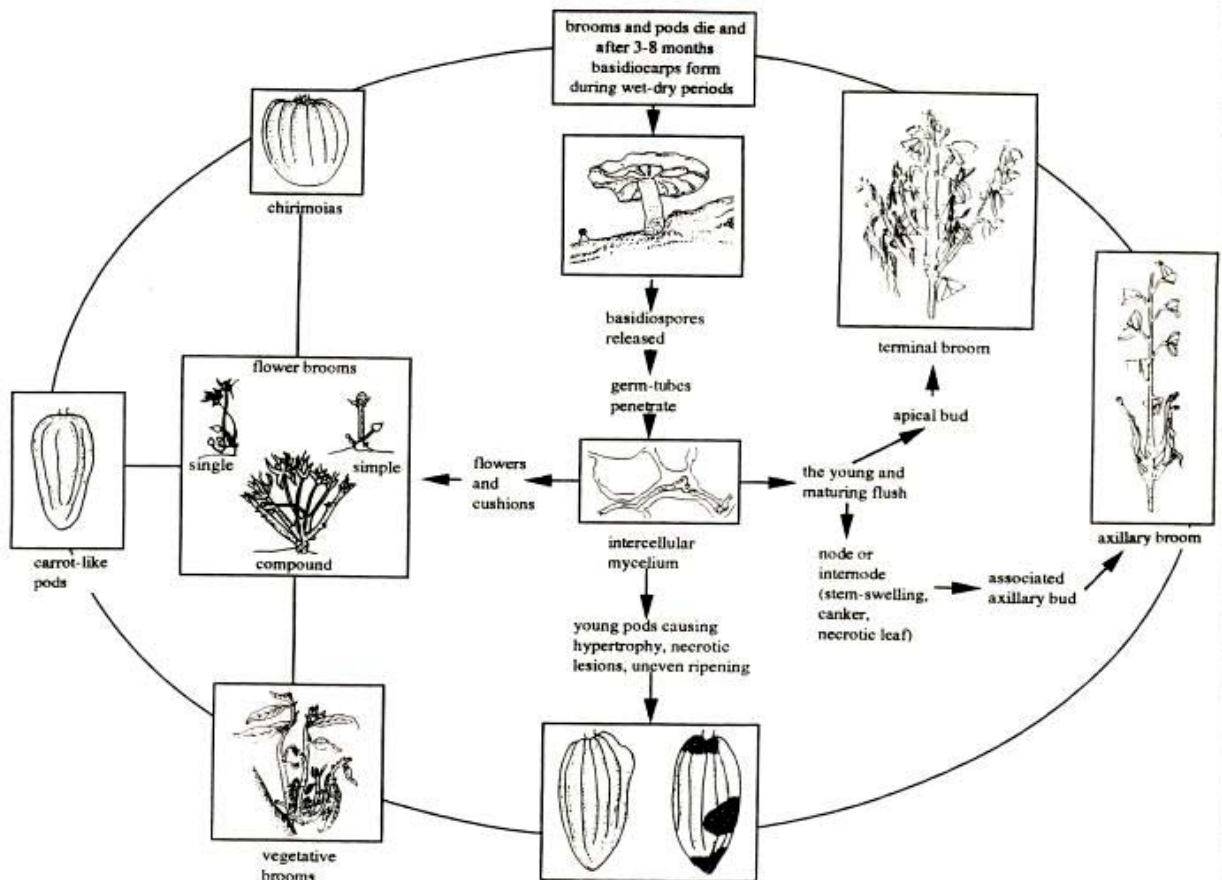


Figura 1. Ciclo de vida de *Crinipellis perniciosus*. Extraído de WHEELER, 1985.

2.2 Interação planta-patógeno

Interações entre plantas e patógenos são conhecidas há muitos anos, sendo que muitos microorganismos são capazes de causar doenças em plantas ocasionando sérios danos à agricultura (JACKSON & TAYLOR, 1996). Uma série de sintomas de doenças foram descritos na literatura e inúmeras alternativas já foram utilizadas para contenção da dispersão e ataque de patógenos.

Em resposta as invasões pelos microorganismos, plantas ativam uma série de mecanismos de defesa (HAMMOND-KOSACK & JONES, 2000). Muitos avanços têm sido alcançados na identificação destes componentes envolvidos nos caminhos de transmissão de sinal acoplados ao reconhecimento de patógenos e ativação de respostas de defesa (KUNKEL & BROOKS, 2002). Para colonizar com sucesso um hospedeiro, o patógeno deve desenvolver a habilidade de se sobrepôr às barreiras de defesa elaboradas pela planta para prevenir a infecção. Este processo de coevolução é extremamente dinâmico e tem resultado na utilização de estratégias de infecção altamente sofisticadas e específicas (LEACH *et al.*, 2001, OKU, 1992).

O estudo destas interações é de grande valia por conduzir ao entendimento dos processos básicos desencadeados, provendo subsídios para erradicação de processos patogênicos.

2.2.1 Infecção de fungos em plantas

Cerca de 300.000 espécies de plantas são atacadas por fungos patogênicos (KNOGGE, 1996). A evolução destes fungos para um alto grau de especificidade voltada a espécies individuais de plantas pode ser refletida nos diferentes níveis de especialização observados nas interações plantas-fungos existentes. Visando colonizar plantas, os fungos têm desenvolvido estratégias altamente especializadas e diversificadas.

Para penetração geralmente são capazes de secretar enzimas hidrolíticas e proteolíticas, sendo que em saprofitos isto é necessário para implementação da patogênese (KNOGGE, 1996). Durante a penetração, a liberação de oligossacarídeos pode vir a elicitar uma série de respostas do hospedeiro. Uma das estratégias mais utilizadas por fungos para colonização de plantas é a secreção de toxinas (ASAI *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1996). Fitotoxinas têm sido identificadas em um grande número de patógenos e possuem graus variáveis de especificidade para diferentes espécies de plantas (OKU, 1992). Cada toxina exibe um modo específico de ação, inativando enzimas vegetais, como é o caso da toxina HC de *Cochliobolus carbonum* e da toxina AAL de *Alternaria alternata* que parecem ativar um programa de morte celular em plantas de tomate e *Arabidopsis* (GECHEV *et al.*, 2004; WOLPERT *et al.*, 2002). Alguns fungos produzem toxinas não específicas, tal como *Fusicoccum amygdalli* que é capaz de produzir a toxina fusicoccina que conduz a irreversível abertura dos estômatos, seguida por morte celular e colonização necrotrófica em muitas espécies de plantas (HAMMOND-KOSSACK & JONES, 2000).

Os fungos patogênicos são capazes de crescer preferencialmente ou exclusivamente em um número limitado de hospedeiros, sendo que para tornar o alcance do patógeno restrito, alguns fatores têm que existir (JACKSON & TAYLOR, 1996; KNOGGE, 1996). A base molecular para o reconhecimento de patógenos potenciais, por plantas, é baseada no sistema gene a gene (FLOR, 1955 apud KOSACK & JONES, 2000). Plantas são capazes de reconhecer o invasor por meio do reconhecimento de fatores externos que estão presentes na superfície do fungo ou proteínas secretadas por estes (HAHN, 1996). Após o reconhecimento do patógeno, uma série de reações é iniciada, tais como fluxo de íons através da membrana, geração de espécies de Oxigênio altamente Reativas (explosão oxidativa), fosforilação de proteínas específicas, ativação transcricional de genes de defesa, entre outras (BLUMMWALD *et al.*, 1998; SCHEEL, 1998; GRANT & MANSFIELD, 1999; HAMMOND KOSACK & JONES, 1996). Apesar de que estas reações de defesa devam conter a disseminação do patógeno, em algumas interações específicas este mecanismo não tem tido sucesso. Em alguns fungos, foi possível o isolamento de moléculas capazes de desencadear essas reações, denominadas elicitores (HAHN,

1996; KNOGGE,1996; MONTESANO *et al.*, 2003). A hipótese gene a gene pode ser interpretada em termos bioquímicos como a interação de elicitores específicos do patógeno com um receptor específico do hospedeiro (MONTESANO *et al.*, 2003). Estes receptores traduzem a informação de numerosos genes através de uma rede de sinalização intracelular que orquestra uma extensiva reprogramação das células afetadas.

2.2.2 Elicitores

Originalmente o termo elicitor foi utilizado para moléculas capazes de induzir a produção de fitoalexinas, mas agora é comumente usado para compostos que estimulem qualquer tipo de resposta de defesa (MONTESANO *et al.*, 2003). Eles não possuem estrutura química comum, pertencendo a um grande número de diferentes classes de compostos, incluindo oligossacarídeos, peptídeos, proteínas e lipídios. Elicitores atuam em baixas concentrações como compostos sinalizadores, fornecendo informações para desencadeamento de respostas de plantas (HAHN, 1996).

Em interações necrotróficas compostos fúngicos podem atuar como elicitores, desencadeando processos de morte celular em plantas, como ocorre no caso da toxina Fumonisina B1 do fungo necrotrófico *Fusarium moniliforme* colonizando *Arabidopsis* (STONE *et al.*, 2000). Em espécies de *Phytophthora*, patógenos reconhecidamente destrutivos de espécies agriculturalmente importantes, são secretadas proteínas extracelulares altamente conservadas denominadas elicinas (TYLER, 2002; YU, 1995). O papel das elicinas na biologia de *Phytophthora* não é claro, porém sua união a fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes relacionados com a defesa parece contribuir com a patogenicidade (TYLER, 2002). Além disso, em células de tabaco, elas são capazes de induzir necrose e respostas vigorosas de defesa e resistência contra ataques subseqüentes de patógenos (HAHN, 1996; YU, 1995). No ano de 1998, foi identificada uma proteína extracelular denominada elicina INF1

presente em *Phytophthora infestans* capaz de induzir resposta hipersensível em *Nicotiana benthamiana* (KAMOUN, 1998; KAMOUN, 2003).

Uma série de outras proteínas relacionadas com o processo de desencadeamento de necrose foram identificadas em diferentes espécies. Em *Fusarium oxysporum* ocorre a produção de uma proteína de 24KDa, (NEP1), que induz necrose, ativa a produção de etileno e altera a produção de espécies oxigênio reativas em folhas de tabaco (JENNINGS *et al.*, 2001), além de ativar genes envolvidos em resposta de estresse, tais como ferimento, seca, senescência e resistência à doença em *Arabidopsis*, *Centaurea maculosa* e *Taraxacum officinale* (KEATES *et al.*, 2003). Após isolamento e caracterização de NEP1, genes e produtos relacionados têm sido identificados em espécies de organismos taxonomicamente distintos, tais como oomicetos: *Pythium*, *Phytophthora* e bactérias *Bacillus halodurans*.

Em *Phytophthora parasitica* foi identificada e purificada uma proteína indutora de necrose (NPP1) de 24KDa, cuja infiltração induziu lesões características de HR, produção de fitoalexinas, síntese elevada de etileno, reforço da parede celular entre células necróticas e saudáveis (calose) e acúmulo de transcritos de genes de defesa em folhas de *Arabidopsis* (FELLBRICH *et al.*, 2002). No ano de 2001, uma nova proteína elicitoria de 234 aminoácidos PaNie, foi isolada de *Pythium aphanidermatum*, patógeno cosmopolita que tem causado danos a inúmeras colheitas importantes. O tratamento de protoplastos de cenoura com esta proteína, levou à fragmentação do DNA e formação do DNA ladder, um dos traços característicos de morte celular. O tratamento de folhas de *Arabidopsis* e Tabaco resultou em necrose e deposição de calose (VEIT *et al.*, 2001).

Por meio da análise de 3.035 ESTs de micélio e zoósporos de *Phytophthora sojae* e de tecido de soja infectado foi possível a identificação de uma proteína indutora de necrose de 25.6KDa similar em seqüência as já depositadas em bancos de dados. Esta proteína se mostrou uma poderosa indutora de necrose e morte celular. A detecção de transcritos de PsojNIP durante a transição de *P. sojae* do estágio biotrófico para necrotrófico e o alto nível de expressão durante os últimos estágios de interação compatível, sugere que esta proteína é um elicitor-toxina que acelera morte celular de

plantas durante a fase necrotrófica para obter vantagens (QUTOB *et al.*, 2002; QUTOB *et al.*, 2000).

Similaridade de seqüências em banco de dados foi observada para seqüências de *Phytophthora parasítica*, *Phytophthora sojae*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus halodurans* (Tabela 1). Nenhuma similaridade com seqüências de plantas foi detectada, sugerindo que estas proteínas são características de microorganismos.

Tabela 1. Caracterização dos principais indutores de necrose já identificados

Elicitor	Organismo	Principais efeitos em plantas
NEP 1	<i>Fusarium oxysporum</i>	Necrose, produção de etileno e espécies Oxigênio ativas.
PaNie	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Deposição de calose, fragmentação do DNA e morte celular programada.
PsojNIP	<i>Phytophthora sojae</i>	Resposta de hipersensibilidade (HR).
NPP1	<i>Phytophthora parasitica</i>	Produção de fitoalexinas, etileno e calose, geração de espécies Oxigênio ativas, crescimento dos níveis de Cálcio citoplasmático e morte celular.
INF 1	<i>Phytophthora infestans</i>	Resposta de hipersensibilidade (HR).
Fumonisina B1	<i>Fusarium moniliforme</i>	Geração de espécies Oxigênio ativas, acúmulo de fitoalexinas, deposição de compostos fenólicos e calose e morte celular.
Prot. Indutora de necrose e etileno	<i>Bacillus halodurans</i>	Necrose e produção de etileno.

Fontes: (KEATES *et al.*, 2003), (QUTOB *et al.*, 2002), (VEIT *et al.*, 2001), (JENNINGS *et al.*, 2001), (QUTOB *et al.*, 2000), (STONE *et al.*, 2000), (KAMOUN,1998), (HAHN, 1996) e (YU, 1995).

2.2.3 Mensageiros secundários

Muitos elicitores de patógenos são responsáveis pelo aumento da síntese de etileno, Ácido Jasmônico e Ácido Salicílico, moléculas reconhecidas como mensageiros secundários em complexos de proteção. Estas moléculas são necessárias à ativação de genes de defesa, contribuindo para o aumento da resistência em plantas. Adição de Ácido Jasmônico em culturas celulares de soja, aumenta os níveis de transcrição de genes de defesa (CREELMAN *et al.*, 1992), assim como ocorre em folhas de *Arabidopsis* (BELL & MULLET, 1993). Mutantes de *Arabidopsis* deficientes na produção de Ácido Jasmônico são incapazes de desencadear respostas de defesa a patógenos, diferentemente do que ocorre em plantas selvagens, o que reafirma o papel de proteção desempenhado por esta molécula sinalizadora (TURNER *et al.*, 2002).

Acúmulo de Ácido Salicílico (AS) é requerido para indução de SAR (Resistência Sistêmica Adquirida), sendo um importante modulador da susceptibilidade de plantas a infecções por patógenos e na resistência genética a doenças (CONRATH *et al.*, 2002; WEES *et al.*, 2000). Estudos genéticos têm mostrado que o AS é requerido para rápida ativação de respostas de defesa que são mediadas por muitos genes de resistência e para indução de defesas locais que contêm o patógeno (KUNKEL & BROOKS, 2002) A transcrição de genes de resistência RPW8.1 e RPW8.2 em *Arabidopsis*, acentuada pela via do AS, leva a lesões típicas de HR (XIAO *et al.*, 2003). Propõe-se que o AS possa inibir a catalase levando ao acúmulo de H₂O₂, porém medidas de concentração de H₂O₂ em tabaco inoculado com TMV não corroboram essa proposta (RYALS *et al.*, 1995)

O Etileno é um hormônio que possui múltiplas funções fisiológicas em plantas, sendo que se destaca em promover senescência. Sabe-se que também é produzido em resposta a ferimentos, à infecção por patógenos e a elicitores de mecanismos de defesa. Seu papel em resposta aos patógenos não é muito claro, uma vez que em mutantes de tomate, insensíveis ao etileno, houve redução dos sintomas de doenças causadas por fungos e bactérias (LUND *et al.*, 1998) e em espécies de *Arabidopsis* e tomate, em que houve super expressão do fator de Resposta ao Etileno, foi capaz de

conferir resistência a fungos necrotróficos (BERROCAL-LOBO *et al.*, 2002; DÍAZ *et al.*, 2002). O etileno também desencadeou susceptibilidade e resistência em mutantes de soja, com sensibilidade reduzida ao etileno, em resposta a diversos tipos de patógenos, sugerindo-se que a sensibilidade ao etileno está diretamente ligada ao tipo específico de patógeno, sendo benéfico contra a invasão de alguns patógenos, mas ineficaz contra outros (HOFFMAN *et al.*, 1999). O efeito aditivo destes mensageiros em alguns casos é necessário para desencadeamento da resposta celular.

2.3 MORTE CELULAR PROGRAMADA

2.3.1 Histórico:

Em 1858, Virchow descreveu um fenômeno degenerativo em células animais ocasionado por fatores tais como isquemia, hipotermia ou hipertermia severa, traumas químicos ou físicos e alta concentração de agentes tóxicos. Estas células exibiam características morfológicas e bioquímicas bem distintas. As transformações iniciais se caracterizavam pelo crescimento no volume celular, ruptura da membrana plasmática, liberação do conteúdo celular no espaço intercelular, o que causava um processo inflamatório que danificava as células vizinhas denominado necrose (TORRES & VARGAS, 2003). William Councilman, em 1890, foi o primeiro cientista a descrever o processo de apoptose propriamente dito, por meio da observação de corpos acidófilos vacuolados no fígado de pacientes com febre amarela. Em 1965, porém, Kerr fez uma descrição detalhada desta forma geneticamente programada de morte celular, analisando histologicamente células de fígado de roedores, criando desta forma os alicerces para seu estudo. Este fenômeno foi então denominado de “apoptose” por Kerr, Wyllie e Currie e teve a denominação derivada do grego, apo - separação e ptosis - queda. Este termo foi utilizado pelos gregos antigos para descrever a queda de flores e folhas das árvores durante o Outono (TORRES & VARGAS, 2003). Em 1972, Kerr,

Willie & Currie, descreveram as transformações morfológicas celulares observadas durante uma morte celular geneticamente controlada sob variadas condições de estímulos ambientais (DANON *et al.*, 2000).

São conhecidas duas formas de morte celular, a necrose, que se caracteriza pelo rompimento da membrana plasmática com subsequente inchamento celular e lise, e a apoptose, processo geneticamente programado que se caracteriza pela condensação nuclear, encolhimento do citoplasma, clivagem do DNA nuclear em oligonucleossomos e pela formação de corpos apoptóticos (DANGL *et al.*, 2000).

O processo apoptótico é dividido em três fases. A primeira consiste na fase de iniciação, na qual a célula recebe estímulos que iniciam a seqüência de eventos. Indutores de morte celular podem ser fisiológicos, biológicos, químicos ou físicos (TORRES & VARGAS, 2003). A fase de execução transcorre com ativação de uma rede de sinalização, ativação enzimática, alterações na mitocôndria, como alteração do potencial transmembrana e liberação do citocromo C, aumento nos níveis de espécies de Oxigênio Reativas, fragmentação e contração da cromatina (MITTLER, 1998). A última fase caracteriza-se pela degradação de DNA e proteínas nas células, sendo que em animais há remoção celular por fagócitos (TORRES & VARGAS, 2003).

2.3.2 Morte celular durante o desenvolvimento

Hoje se sabe que a PCD é um mecanismo molecular utilizado em larga escala nos processos de desenvolvimento celular e necessário ao crescimento regular de organismos multicelulares. Sendo um processo de grande complexidade, pode se manifestar de diferentes formas, tendo características moleculares e morfológicas bastante variadas a depender do contexto em que ocorre em plantas e animais.

Em animais, o processo tem sido bastante estudado em diferentes estágios do desenvolvimento, do nascimento à morte, como observado na formação dos dedos do embrião ou na degeneração de neurônios que falham nas conexões nervosas. A PCD

inapropriada é observada em muitos casos de doenças humanas, tais como Parkinson, Alzheimer, AIDS e alguns tipos de câncer (DANON *et al.*, 2000).

Assim como em animais, morte celular é ativada em muitos processos de desenvolvimento em plantas, da formação dos órgãos sexuais a senescência (Figura 2) Na reprodução de plantas a PCD pode ocorrer na geração de flores unissexuais, onde torna-se necessária para eliminação do primórdio do órgão sexual feminino (gineceu) ou do órgão sexual masculino (androceu); no aborto de megasporos, sendo necessária para eliminação de três das quatro células haplóides produzidas, deixando a célula remanescente produzir o ovo e as células associadas ao embrião; na prevenção da auto polinização, quando grãos de pólen que se auto polinizaram sofrem PCD levando ao conseqüente crescimento da variabilidade genética (MITLER, 1998; PENNEL & LAMB, 1997; GREENBERG, 1996).

A PCD também é observada durante o processo de embriogênese e germinação, sendo necessária a eliminação do suspensor após execução da sua função. O suprimento celular necessário ao desenvolvimento e germinação de embriões é originado de células do endosperma que sofrem PCD. Na maturação de órgãos a PCD é vista na formação dos elementos traqueais, partes características e essenciais do xilema de plantas, na morte de células da coifa e caule (PENNEL & LAMB, 1997; DANGL *et al.*, 2000). Células da coifa morrendo encolhem, adotam perfis irregulares e condensação nuclear (WANG *et al.*, 1996). A forma mais comum de morte celular durante o desenvolvimento em plantas é a formação dos elementos traqueais. Após serem originadas, essas células sofrem alongamento, deposição da parede celular secundária, lignificação e finalmente o processo de PCD (DANGL *et al.*, 2000; MITLER, 1998).

A senescência em plantas é um processo reconhecidamente ativo, que segue um programa genético pré-estabelecido, sendo dessa forma definido como PCD durante o desenvolvimento. Ela é acompanhada por uma série de transformações bioquímicas e estruturais que inclui a indução de uma série de enzimas (COUPE *et al.*, 2004), além sofrer influência de hormônios, tais como etileno e citocina (HONG *et al.*, 2000). Dois tipos de senescência são conhecidos em plantas, a que ocorre em órgãos,

tais como folhas, pétalas, frutos, ramos e raízes e a senescência de toda a planta, um processo visto em algumas plantas após fertilização e desenvolvimento de sementes.

2.3.3 Morte celular desencadeada por estímulos bióticos e abióticos

Em plantas, PCD também é ativada em resposta a uma série de mudanças ambientais, tais como presença de toxinas (STONE *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1996), agentes químicos (JONG *et al.*, 2000; RYERSON & HEATH, 1996), estresse mecânico (GARCÊS *et al.*, 2001), mudança gravitacional (PEDROSO & DURZAN, 2000) assim como em presença de patógenos (RYERSON & HEATH, 1996).

Adaptações às condições ambientais adversas resultam em eliminação de algumas células por PCD, assim como ocorre em células do aerênquima de caules, raízes e pecíolos submersos submetidos a condições de baixa oxigenação (hipoxia) e em células de plantas submetidas a condições de baixa umidade e alta luminosidade (DREW *et al.*, 2000). Neste caso, há formação de uma camada protetora de células com intuito de bloquear os danos à planta (MITLER, 1998).

A Resposta de Hipersensibilidade (HR) é o processo de PCD mais conhecido em plantas e caracteriza-se por uma resposta rápida ocorrida no sítio de infecção levando a formação de uma lesão localizada, delimitada por tecido saudável, visando inibir a dispersão do agente invasor (GREENBERG & YAO, 2004; GREENBERG, 1997; PENNEL & LAMB, 1997). Os elicitores, que são moléculas produzidas pelo patógeno como resultado de uma interação patógeno-hospedeiro, induzem em muitos casos respostas bioquímicas e celulares características de morte celular (FELLBRICH *et al.*, 2002; QUTOB *et al.*, 2002; JENNINGS *et al.*, 2001; VEIT *et al.*, 2001; DANGL *et al.*, 2000). Apesar das inúmeras tentativas de obter-se sucesso com estes mecanismos de defesa, a resposta Hipersensível é em muitos casos, observada como resposta ao desenvolvimento da doença, sendo considerada resultado da liberação de compostos pelo patógeno, como por exemplo, a toxina AAL de *Alternaria alternata* (GECHEV *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 1996) e a Fumonisina B1 de *Fusarium moniliforme* (ASAI *et al.*,

2000; STONE *et al.*, 2000). Muitas evidências sugerem que HR resulta da ativação de um processo de PCD, inclusive demonstrou -se que a ativação de morte celular durante a HR requer atividade da maquinaria de transcrição da planta (GREENBERG & YAO, 2004).

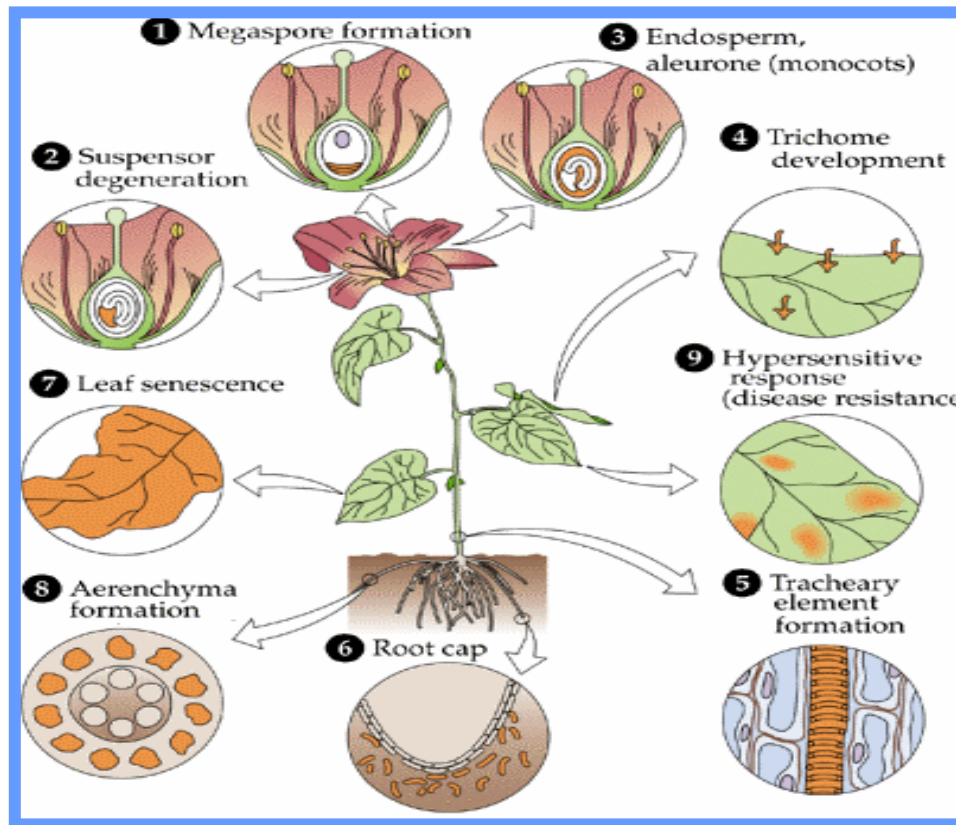


Figura 2. Eventos de morte celular programada que ocorrem em plantas. Extraído de DANGL *et al.*, 2000.

2.3.4 Caracterização do processo de morte celular programada

Os estudos hoje existentes que caracterizam o processo de morte celular revelam uma variedade de fenótipos diferenciados. O primeiro e maior evento molecular descrito, consiste em um ativo processo de fragmentação nuclear, levando a formação de um ladder de DNA detectado por meio de eletroforese em gel de agarose (LILJEROTH & BRYNGELSSON, 2002; RYERSON & HEATH, 1996). Tipicamente este ladder consiste de fragmentos de múltiplos de 180 a 200 pares de bases. Pode-se também detectar uma degradação não específica, que resulta em um padrão randômico de fragmentos de DNA, detectada como um rastro de DNA observado em gel de agarose corado com brometo de etídio. Esta diferença pode resultar do tempo de clivagem de proteínas nucleossomais. Se as proteínas são digeridas antes da ativação de nucleases, o padrão de degradação será randômico, porém, se as endonucleases são ativadas antes da digestão proteolítica dos nucleossomos os fragmentos gerados serão múltiplos de 180-200 pares de bases (MITTLER *et al.*, 1998).

O acúmulo de compostos tóxicos, tais como fitoalexinas, compostos fenólicos e deposição de calose também é descrito na literatura em determinadas condições de morte celular em vegetais (FELLBRICH *et al.*, 2002; VEIT *et al.*, 2001; MITTLER, 1998; BRAGA, 1988). Assim como também a condensação nuclear, alterações de morfologia nuclear e a formação de corpos apoptóticos (CHENG *et al.*, 2003; McCABE *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 1996).

2.3.4.1 Sinalização durante o processo de morte celular

Na tentativa de se compreender os mecanismos de sinalização e desencadeamento de PCD tem havido progresso no sentido de identificar possíveis peças deste intrincado mecanismo. Por meio de inúmeros estudos já é possível relacionar a explosão oxidativa, liberação de fitoalexinas e compostos fenólicos, presença de NO (Óxido Nítrico), alteração no fluxo de Ca^{+2} e outros íons, liberação do

citocromo c mitocondrial, segundos mensageiros (etileno, Ácido Jasmônico e Ácido Salicílico) e suas possíveis interações com o controle deste sistema. Devendo ser evidenciado que diferentes sinais existem em diferentes plantas para diferentes tipos de resposta.

Alteração no fluxo de íons (Influxo de Ca^{+2} e efluxo de K^{+} e Cl^{-}) através da membrana é uma das respostas mais antigas descritas neste mecanismo. Com o aumento do fluxo de Cálcio intracelular ocorre um crescimento do Cálcio citossólico (JONES, 2001; CHRISPEELS *et al.*, 1999). A união subsequente de Cálcio a Calmodulina, quinases, fosfatases, fosfolipases, nucleases e proteinases dependentes de Ca^{+2} facilita a transmissão de sinal dirigida para ativação de uma resposta celular específica (BLUMWALD *et al.*, 1998).

Acredita-se que haja uma correlação entre a atividade do elicitador de patógenos, a alteração no potencial de membrana e influxo de Cálcio (GRANT & MANSFIELD, 1999; EBEL & MITHOFER, 1998). Canais de íons, presentes na Membrana plasmática de células de plantas, permeáveis ao Ca^{+2} podem mediar o influxo de Ca^{+2} induzido por elicitador e conseqüentemente conduzir a quantidades crescentes de Ca^{+2} no citoplasma (GELLI *et al.*, 1997). Tratamento de células de salsa com o elicitador Pep 13 de *Phytophthora sojae* revelou um rápido crescimento no Ca^{+2} citoplasmático. Características estruturais de Pep 13 foram essenciais para união ao receptor, crescimento do Cálcio citoplasmático e ativação de respostas de defesa (BLUME *et al.*, 2000).

Numerosos sinais são provavelmente integrados para ocorrência ou não de morte celular. O controle destes sinais deverá ser crucial para o desenvolvimento ótimo do processo podendo ser executado por diferentes fitohormônios. O Ácido Salicílico, importante mediador de resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas pode atuar juntamente com o NO para indução de HR (LAM, 2004) e atuar conjuntamente com Jasmonato e etileno para o desencadeamento de PCD, como observado em protoplastos de *Arabidopsis* tratados com a toxina fúngica Fumonisina (FB1) (ASAI *et al.*, 2000).

O fitohormônio etileno está diretamente envolvido no desencadeamento da senescência, assim como em outras formas de morte celular que ocorrem durante o

desenvolvimento (HONG *et al.*, 2000). Em suspensões celulares de tomate sofrendo apoptose induzida por camptotecina (conhecido indutor de morte celular em animais) foi demonstrado que o etileno tem um papel regulatório na liberação de Espécies Oxigênio Ativas (JONG *et al.*, 2002). Evidência esta que corrobora para a sugestão da importante ação desempenhada pelo etileno como potencializador da explosão oxidativa em eventos de morte celular.

Espécies Oxigênio Reativas estão reconhecidamente envolvidas no processo de morte celular. Muitas reações intracelulares reduzem O_2 a Superóxido (O_2^-) ou Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), levando a formação de radicais Hidroxi (OH^-) que são altamente reativos e podem ser responsáveis por uma série de danos oxidativos às células. A expressão de genes relacionados a interconversão de Espécies Oxigênio reativas, tais como genes da Superóxido dismutase, catalase e peroxidase, foi identificada em estudos de microarranjos em *Arabidopsis* sofrendo morte celular (GECHEV *et al.*, 2004; SWIDZINSKY *et al.*, 2002).

Acredita-se que o processo de produção de espécies Oxigênio Reativas seja responsável pela ativação do programa de morte celular (LAM *et al.*, 1999; JACOBSON, 1996). A indução de morte celular é possível utilizando-se tratamentos com baixas dosagens de ROS, como visto em folhas de tomate inoculadas com H_2O_2 (LU & HIGGINS, 1999). Em folhas de tabaco tratadas com Ozônio foi detectado acúmulo de H_2O_2 em locais que apresentavam lesões características de morte celular (PASQUALINI *et al.*, 2003).

Por H_2O_2 ser a mais estável das moléculas reativas de Oxigênio e difundir-se livremente através das membranas biológicas, sugere-se que pode funcionar como principal sinalizador difundindo-se de célula a célula. A inoculação de folhas de *Arabidopsis* com *Pseudomonas syringae* foi capaz de induzir uma explosão oxidativa secundária em tecidos distantes, conduzindo a respostas sistêmicas de baixa frequência, levando a concluir que ROS (Reactive Oxygen Species) intermedeiam uma rede de sinalização celular (ALVAREZ *et al.*, 1998). Porém, a aplicação de elicitor em folhas de tabaco induziu acúmulo de H_2O_2 e Resposta Hipersensível restrita a zona infiltrada (COSTET *et al.*, 2002).

Em se tratando de fungos necrotróficos, existem evidências que sugerem que a produção de ROS, como resposta à infecção é fator determinante para colonização (MAYER *et al.*, 2001; GOVRIN & LEVINE, 2000). Levando a crer que a liberação de espécies Oxigênio Ativas é efetiva dependendo do patógeno e da planta envolvidos.

Em animais, Óxido Nítrico (NO) é conhecidamente uma molécula mensageira biologicamente ativa, atuando em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo apoptose. Na presença de Superóxido, torna-se um potente radical livre atuando sinérgicamente com espécies Oxigênio Ativas e levando ao surgimento de morte celular oxidativa em células vegetais (GARCÊS *et al.*, 2001) Em calos e folhas de *Kalanchoe daigremontiana* e *Taxus brevifolia* em processo de apoptose, diagnosticou-se a produção crescente de NO, juntamente com a fragmentação do DNA (PEDROSO *et al.*, 2000a), assim como, foi também observado em células de *Taxus brevifolia* (PEDROSO *et al.*, 2000b). A produção de NO também foi aumentada em células de folhas de *Kalanchoe* submetidas a diferentes ambientes gravitacionais e em folhas de *Arabidopsis* submetidas a estresse mecânico, tratamentos reconhecidamente indutores de apoptose (GARCÊS *et al.*, 2001; PEDROSO & DURZAN, 2000). Estes resultados demonstram a importância de NO em processos de morte celular ocorridos em plantas.

A mitocôndria é considerada principal organela envolvida no processo de PCD, sendo geradora de sinais para a regulação deste evento. O principal mediador bem caracterizado existente em mitocôndrias de células animais é o citocromo c (LAM, 2004). O mecanismo pelo qual o citocromo c é liberado da mitocôndria durante a apoptose permanece desconhecido, embora alguns modelos já tenham sido propostos, tais como rompimento da membrana externa da mitocôndria ou alteração da sua permeabilidade (LUDOVICO *et al.*, 2002). A indução de genes associados à atividade mitocondrial, durante a invasão por patógenos e senescência, foi observada em células de *Nicotiana tabacum* (MAXWELL, 2002), sugerindo desse modo, o envolvimento da mitocôndria em condições que engatilham a PCD em plantas. Evidências sugerem que os sinais que conduzem à morte, em forma de ROS ou de proteínas efetoras, gerados por esta organela podem ser conservados em eucariotos (LACOMME & SANTA CRUZ, 1999; LAM *et al.*, 1999).

Dentre as crescentes observações que indicam que o mecanismo funcional de PCD é conservado entre animais e plantas, destaca-se a recente descoberta da existência de caspases em vegetais. Estas proteínas pertencem a uma classe de cisteína-proteases específicas que mostram um alto grau de especificidade com absoluto requerimento para clivagem adjacente a um resíduo de aspartato e uma sequência de reconhecimento de ao menos 4 aminoácidos N-terminais ao sítio de clivagem (WOLTERING *et al*, 2002). São conhecidas 14 caspases em mamíferos, sendo que em humanos 12 já foram identificadas (TORRES & VARGAS, 2003).

Caspases são sintetizadas como pró-enzimas e são ativadas por um proteólise direta que remove o peptídeo amino-terminal e cliva o domínio proteolítico em sítios de reconhecimento específicos. No geral, a morte celular envolve uma seqüência de eventos de ativação de caspases nos quais caspases iniciadoras ativam caspases executoras que processam uma variedade de proteínas alvo, eventualmente levando ao fenótipo apoptótico (WOLTERING *et al.*, 2002). O citocromo c mitocondrial liberado para o citosol é reconhecidamente caracterizado como ativador de caspases iniciadoras, pois pode induzir a montagem do complexo ativador da caspase-9 no citosol, denominado apoptosoma (KIM *et al.*, 2003; LUDOVICO *et al*, 2002).

Pesquisas analisando as homologias interativas têm revelado a existência de dois grupos de Cys proteases, as para-caspases que são encontradas em humanos e *C. elegans* e as metacaspases, encontradas em fungos e plantas (WOLTERING *et al*, 2002).

Muitos sistemas foram desenvolvidos para análise da participação de caspases em processos de morte celular ocorridos em plantas. Em tomate, conseguiu-se isolar um gene de metacaspase, denominado LeMCA1, sendo que em folhas de tomate infectadas com *Botrytis cinerea* sofrendo morte celular, houve aumento dos níveis de expressão deste gene (HOEBERICHTS *et al.*, 2003). Químicos conhecidos indutores de morte celular em mamíferos foram utilizados para indução de PCD em células de tomate. Adicionalmente, inibidores de caspases foram testados para inibição deste evento, sendo demonstrado que estes podem ser caracterizados como potentes inibidores da morte celular induzida por químicos em células de planta (JONG *et al.*, 2000).

Também foi detectada, caracterizada e purificada, uma caspase ativada durante a Resposta Hipersensível ao vírus do mosaico do fumo (TMV), em plantas de tabaco (CHICHKOVA *et al.*, 2004). Solomon *et al.*, no ano de 1999 demonstrou que o estresse oxidativo, produzido na morte celular, induz atividade de cisteínas-protases em células de soja inoculadas com uma linhagem de *Pseudomonas syringae*. Assim como, a inibição da atividade destas proteínas levou ao bloqueio da PCD, comprovando o envolvimento dessas proteases e seus possíveis inibidores na PCD em plantas. A análise de expressão gênica durante a morte celular em *Arabidopsis thaliana* identificou o envolvimento de cisteína-proteases neste processo (SWIDZINSKY *et al.*, 2002). Estas evidências indicam que assim como em animais, as caspases executam um papel relevante na morte celular apoptótica em plantas, sendo possivelmente conservadas evolutivamente.

2.3.4.2 Genes envolvidos em apoptose

Apesar da descrição do fenômeno ter sido feita em 1965, apenas no início dos anos 90 o primeiro gene apoptótico (*bcl-2*) foi descoberto em células animais e foi reconhecidamente caracterizado como supressor de apoptose. Posteriormente, foram descobertos outros genes em animais, sendo agora caracterizados como supressores (*bcl-1*, *bcl-2*, *bcl-xl*, *dad 1*) e ativadores (*bax*, *bad*, caspases) de apoptose (TORRES & VARGAS, 2003).

Com estas descobertas em animais, buscou-se esclarecer a existência de possíveis elementos homólogos em plantas. Foram então descobertos mutantes, denominados *disease lesion mimics*, que apresentavam lesões com aparência típica de HR (DANGL *et al.*, 2000; MITLER, 1998). Estas mutações parecem ocorrer em genes de planta que controlam PCD, resultando na ativação ou supressão deste evento. *Disease lesion mimics* foram isolados de tomate, milho, arroz, cevada e *Arabidopsis*, sendo caracterizados como mutantes de iniciação, que desenvolvem lesões espontâneas com um limite definido ou de propagação. Acredita-se que mutantes de iniciação sejam desprovidos de regulação da ativação da morte celular, mas não na inibição no limite da lesão. Em consequência, a lesão vai iniciar-se espontaneamente

devido à mutação, mas será uma lesão com um limite definido, sendo observada em cevada (gene *mlo*) (DANGL *et al.*, 2000; MITLER, 1998).

Nos mutantes de propagação, forma-se uma lesão induzida ou espontânea que se dissemina indeterminadamente, devido a uma mutação ocorrida na via de supressão da morte celular, eventualmente levando a completa morte da folha. Esses mutantes foram descobertos em uma série de plantas, tais como *Arabidopsis*, arroz e milho. Um dos mais conhecidos mutantes desta classe é o *Isd1* de *Arabidopsis*, em que o Superóxido é requerido para formação da lesão (LAM, 2004; DANGL *et al.*, 2000; MITLER, 1998). A expressão deste gene durante PCD foi comprovada por análise de microarray em *Arabidopsis* (SWIDZINSKI *et al.*, 2002). Em mutantes *acd 1* (*accelerated cell death*) de *Arabidopsis* também foram formadas lesões disseminadas similares às observadas em mutantes *Isd1*. Em milho, é conhecido o *l1s1*(*lethal leaf spot1*), em que há uma mutação recessiva responsável pela ocorrência de lesões que se assemelham às formadas em plantas infectadas pelo *Cochliobolus carbonum*. Um cDNA altamente homólogo foi observado em *Arabidopsis* (DANGL *et al.*, 2000; MITLER, 1998).

Sekiguchi lesion (*sl*) é um mutante recessivo de ocorrência natural da classe de propagação que foi observado em arroz. Suas lesões não são apenas observadas em folhas, mas também em raízes como descrito para o mutante de soja *rn* (*root necrosis*) (DANGL *et al.*, 2000).

O estudo destes mutantes, específicos de plantas, é de grande relevância para a compreensão da PCD em vegetais. A clonagem destes genes foi a primeira evidência concreta da existência de genes que regulam a morte celular em plantas.

Análise dos efeitos da expressão de transgênicos que expressam genes de animais, pro e anti-apoptóticos, também está sendo capaz de elucidar questões referentes à genética da PCD em plantas. Uma série de genes de animais, reconhecidamente envolvidos em morte celular, tem sido identificados em plantas.

O homólogo do *defender against apoptotic death 1* (*dad-1*), gene descrito como supressor de morte celular em *Caenorhabditis elegans* e mamíferos foi isolado em *Pisum sativum* e estudos de expressão mostraram que *dad* é constitutivamente expresso em todos os tecidos da planta, sendo que durante a senescência de pétalas ele não foi detectado (ORZÁEZ & GRANELL, 1997). A senescência de órgãos de

plantas é reconhecidamente um processo de morte celular ocorrido durante o desenvolvimento. O alinhamento de seqüências indica que *dad* é altamente conservado em plantas e animais (ORZÁEZ & GRANELL, 1997).

Mitsuhara *et al.*, 1999 registraram que a expressão de transgenes em tabaco, codificando os inibidores de morte celular *bcl-xl* e *ced-9* (homólogo de *bcl-xl* em *C. elegans*), levaram a supressão de morte celular induzida por luz ultra-violeta, tratamento químico e infecção por TMV. Igualmente, plantas de tabaco expressando *bcl-2* e *bcl-xl* de humanos e *ced-9* de nematóides, mostraram-se resistentes a muitos fungos necrotróficos patogênicos, organismos que necessitam do desencadeamento do processo de morte celular para o crescimento, colonização e reprodução no hospedeiro (DICKMAN *et al.*, 2001).

Lacomme & Santa Cruz, 1999 descrevem que o gene *bax*, regulador pró apoptótico da família de genes *bcl-2* em animais, foi expresso em tabaco com a utilização de um vetor viral, sendo capaz de induzir fenótipos típicos de HR, além disso, análises mutacionais mostraram que a mitocôndria é provavelmente o sítio alvo de *bax* em plantas.

O inibidor de *bax* de animais (*bl-1*) é supressor de morte celular e possui homólogos em vegetais. Em células de arroz, tratadas com extrato de *Magnaporthe grisea*, analisadas por meio da técnica de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), a expressão deste gene foi reprimida. Além disso, células de arroz transgênicas super expressando o gene *bl-1* sobreviveram quando tratadas com elicitor de *M. grisea* (MATSUMURA *et al.*, 2002). Análise da expressão de genes durante a morte celular por meio de microarray, identificou os homólogos *at bax inhibitor 1* e *2* em *Arabidopsis* (SWIDZINSKI *et al.*, 2002).

Embora muitas descobertas nesta área ainda estão por vir, indubitavelmente muito conhecimento da genética do processo de morte celular foi adquirido nos últimos anos (Tabela 2). Com as técnicas hoje existentes evoluindo para análises em larga escala, mais rapidamente será possível estabelecer relações entre as rotas de PCD e montar-se um perfil global dos reguladores de morte celular. O estabelecimento de possíveis caminhos comuns em plantas e animais pode levar a compreensão da evolução deste processo em eucariotos.

Tabela 2. Principais genes envolvidos no processo de morte celular.

NOME DO GENE OU MUTANTE	FUNÇÃO OU FENÓTIPO OBSERVADO	OCORRÊNCIA CONHECIDA
MUTANTES		
<i>mlo</i>	Engrossamento da parede celular no local da infecção.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>lsd1</i>	Lesões propagadas	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>acd 1</i>	Lesões disseminadas similares às observadas em mutantes <i>lsd1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>lls 1</i>	Lesões semelhantes às formadas em plantas infectadas por fungos.	<i>Zea mays</i>
<i>sl</i>	Lesões semelhantes às formadas em plantas infectadas por fungos.	<i>Oryza sativa</i>
<i>rn</i>	Acúmulo de compostos antimicrobianos, como fitoalexinas.	<i>Glycine max</i>
GENES		
<i>bcl-xl</i>	supressor de morte celular	Mamíferos
<i>ced-9</i>	supressor de morte celular	Nematóides
<i>dad 1</i>	supressor de morte celular	Nematóides, mamíferos, <i>Pisum sativum</i>
<i>bcl-2</i>	supressor de morte celular	Mamíferos
<i>bax</i>	regulador pró apoptótico	Mamíferos
<i>bi-1 (bax inhibitor 1)</i>	supressor de morte celular	Mamíferos, <i>Oryza sativa</i>
<i>at bax inhibitor 1 e 2</i>	supressor de morte celular	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Fontes: (LAM, 2004). (TORRES & VARGAS, 2003), (SWIDZINSKI *et al.*, 2002), (DICKMAN *et al.*, 2001), (DANGL *et al.*, 2000), (MITSUHARA *et al.*, 1999), (MITLER, 1998) e (ORZÁEZ & GRANELL, 1997),

2.3.5 Técnicas utilizadas para detecção de morte celular

Algumas técnicas atualmente existentes têm sido largamente utilizadas para detecção e estudo de apoptose em diferentes eventos. Dentre elas, a análise do DNA em gel de eletroforese é considerada a técnica mais comum, sendo capaz de mostrar a fragmentação ou degradação do DNA que exibe um padrão típico. A observação de seções de tecido apoptótico também é comumente utilizada para detecção de possíveis alterações celulares ocorridas neste processo (TORRES & VARGAS, 2003).

A técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) é uma das mais freqüentemente utilizadas na detecção e quantificação da apoptose, sendo restritiva à necrose. Esta metodologia foi desenvolvida e descrita no ano de 1992 por Gavrieli e colaboradores, sendo inicialmente utilizada para detecção de fragmentação de DNA de timócitos de camundongo, sendo hoje utilizada em larga escala tanto para células animais quanto para células vegetais. Esta metodologia é baseada na sondagem de extremidades 3' OH, geradas durante a fragmentação, com nucleotídeos modificados em uma reação enzimática (Figura 3). A Terminal deoxinucleotidil transferase é a enzima capaz de catalizar a polimerização dos nucleotídeos marcados com Isotiocianato de Fluoresceína às regiões fragmentadas (GAVRIELLI, 1992).

Uma outra alternativa para análise da ocorrência de morte celular programada é a análise da expressão de genes relacionados ao processo. O surgimento das técnicas de microarranjo e SAGE tem viabilizado a identificação de um maior número de elementos genéticos de PCD em plantas. Como visto em estudos descritos utilizando-se células de *Arabidopsis thaliana* submetidas a condições indutoras de morte celular (SWIDZINSKI *et al.*, 2002) e tratamentos com toxinas fúngicas (GECHEV *et al.*, 2004).

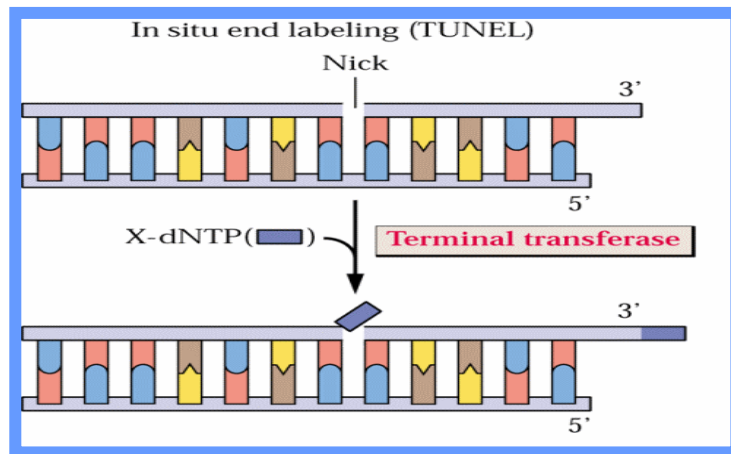


Figura 3. Representação esquemática da técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Extraído de DANGL *et al.*, 2000.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Sementes de *Theobroma cacao* da variedade catongo (susceptível ao *C. pernicioso*) foram plantadas em tubetes plásticos contendo solo esterilizado. As plântulas foram cultivadas em condições de casa de Vegetação no CEPEC/CEPLAC (Centro de Pesquisas da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – Ilhéus Bahia) onde permaneceram até inoculação.

3.2 Inoculação

Plântulas de catongo com quatro semanas foram inoculadas artificialmente por aspersão, com uma suspensão de 1×10^5 basidiósporos viáveis de *Crinipellis pernicioso* .ml⁻¹ (isolado Cp 1441 CEPEC/CEPLAC) na gema apical. Após as inoculações, as plântulas permaneceram por 24 horas em câmara climatizada a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa próxima a 100% para favorecer a germinação, a penetração no hospedeiro e conseqüentemente o estabelecimento da infecção, retornando em seguida à casa de Vegetação (FRIAS *et al*, 1995; SILVA *et al*, 2000). Teste de viabilidade de esporos foi feito em câmara úmida e incubadora (25°C), 24 horas após inoculação, sendo compatível com a viabilidade obtida antes da inoculação. Plântulas de catongo a serem usadas como testemunho, foram inoculadas com água estéril e separadamente submetidas às mesmas condições de câmara úmida. As plântulas foram avaliadas

quanto a expressão de susceptibilidade 4 semanas após inoculação, contando-se o número de plantas com os sintomas da doença.

3.3 Coleta das amostras

Durante 90 dias as plântulas foram analisadas quanto ao desenvolvimento da doença. Meristemas apicais inoculados e não inoculados (controle) foram coletados 45, 60 e 90 dias após a inoculação (DAI) (Figura 4). Após cada coleta, o material necessário às extrações de DNA foi congelado em Nitrogênio Líquido e armazenado em freezer -80°C . As amostras utilizadas para técnica de TUNEL e histologia convencional foram transferidas para frascos de vidro contendo Paraformaldeído 4% em PBS (NaH_2PO_4 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2) permanecendo inicialmente por 10 min no vácuo. Após essa fixação inicial 3 grupos de amostras foram submetidos a 3 diferentes tempos de fixação 1h 15min, 2h 30min e 3h45min a 25°C , sendo as amostras em seguida armazenadas em Etanol 70% a 4°C .

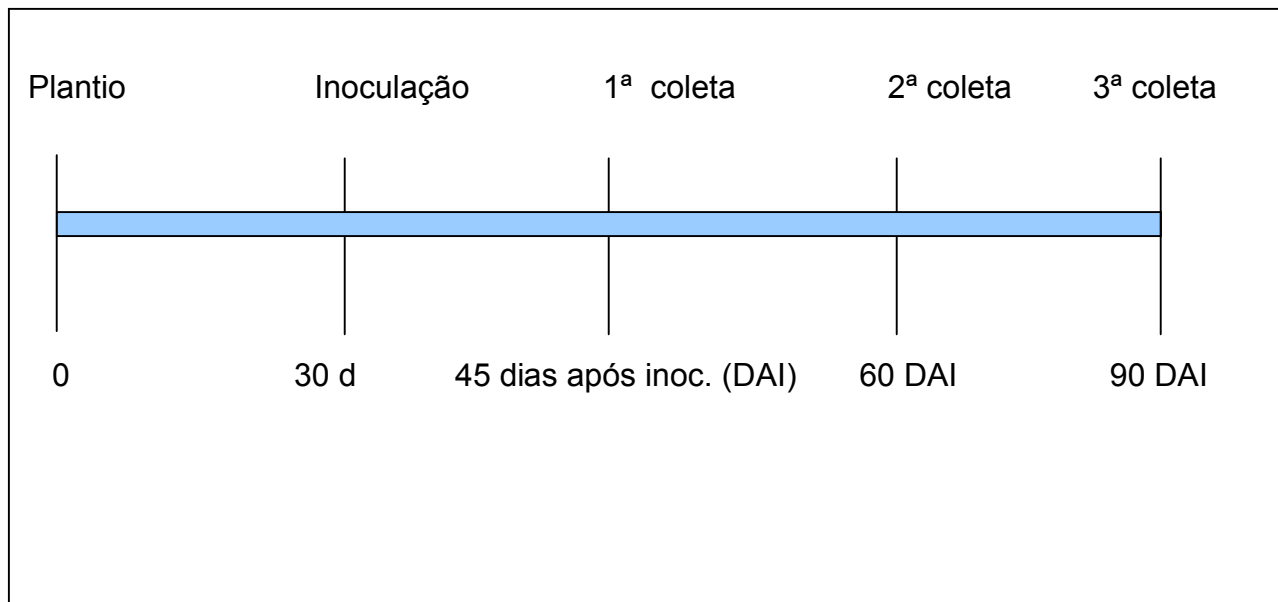


Figura 4. Delineamento experimental de coleta dos meristemas utilizados para as análises de morte celular.

3.4 Extração de DNA e eletroforese

A extração de DNA de meristemas de cacau deu-se de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle, 1990, contendo modificações. Aproximadamente 300 mg de material vegetal foi congelado e macerado em Nitrogênio Líquido. Após adição de 800µl de tampão de Extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, Tris HCl 100mM pH 8, PVP 2%, β-mercaptoetanol 0,2% e proteinase k 20 µg/ml) foram mantidos por 40 min a 65°C e então centrifugados (microcentrífuga eppendorf 5417R) a 14000 rpm por 5 min. 800µl de Clorofórmio-álcool isoamílico (24:1; v/v) foi utilizado 2 vezes com agitação durante 5 min cada, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. A precipitação do DNA foi realizada com Isopropanol gelado 1:1 (isopropanol:sobrenadante; v/v) de um dia para o outro a 4°C e a lavagem do precipitado com 300µl de etanol 70% e 96% por 2 vezes cada. O precipitado foi ressuspendido em 50µl de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8) contendo RNase, livre de DNase (80µg/ml) e incubado a 37° C por 30 min. Sendo então, quantificado por espectrofotometria com ABS (_{260/280}).

Para verificação do possível padrão de degradação de DNA durante o desenvolvimento da doença, procedeu-se eletroforese em géis de agarose com concentrações variando entre 1 a 2%. O gel foi posteriormente corado Brometo de Etídio (0,5µg/ml), visualizado em transiluminador UV (Vilber Loumart)) e fotografado em sistema de fotodocumentação EDAS-290 (Kodak).

3.5 Análises de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick end labeling)

3.5.1 Desidratação e inclusão em parafina

Meristemas de *Theobroma cacao* inoculados e não inoculados com *Crinipellis pernicioso*, armazenados em etanol 70%, foram desidratados por meio de uma série Butanólica Terciária (70%, 85%, 95% e 100% (v/v)) em bomba a vácuo (FABBE Primar), sendo 30 minutos cada etapa. Posteriormente, as amostras foram imersas em Butanol Terciário absoluto com trocas nos intervalos de 1 hora, 6 horas e 1 hora e transferidas para solução contendo Butanol Terciário e óleo de parafina por 2 horas. Metade dessa solução foi descartada após o intervalo de 2 horas, acrescentando-se Butanol terciário e parafina por mais 2 horas a 60° C. Por último, foram feitas 2 trocas totais de parafina a 60° C, por 2 horas cada.

3.5.2 Emblocamento e corte

Meristemas inclusos em parafina foram montados em suporte de madeira, lapidados manualmente e mantidos a 4° C. As secções transversais foram feitas em micrótomo Leica RM 2145, com espessura de 12µm e montadas em lâminas contendo Adesivo de Haupt e Formalina a 2% em placa aquecida, para distensão do material. Após montagem, as lâminas foram mantidas em estufa a 45° C por 2 dias. Quatro grupos de lâminas foram preparados: controle negativo (incubação apenas com solução de sondagem), controle positivo (tratamento com DNase) e testes (inoculados e não inoculados).

3.5.3 Desparafinação e rehidratação

As secções foram desparafinadas em placa aquecida por 30 min a 60° C, seguido de imersão em xilol 2x por 10 min e 1x por 5 min em placa aquecida. A rehidratação foi feita em concentrações decrescentes de etanol (100% (v/v) durante 5 minutos por 2 vezes, 95% (v/v) durante 5 minutos por 2 vezes, 75% (v/v) durante 5 minutos por 2 vezes) a temperatura ambiente, seguida de água corrente e destilada por 3 minutos cada.

3.5.4 Permeabilização e detecção da fragmentação do DNA

O cortes foram lavados por cinco vezes em PBS (NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2) durante 1 hora a 25 °C e incubados por 30 minutos em uma solução contendo pectinase (Merck) 4% (v/v) e celulase Onozuka R-10 (Merck) 2% (v/v) em PBS. Sendo em seguida, mais uma vez lavados em PBS por 5 minutos e incubados por 20 minutos em metanol em ácido acético 1%(v/v). Após mais uma lavagem em PBS por 5min, houve a incubação em proteinase K USB™ (20µg /ml em Tris HCl 10mM, pH 7,5) a 37°C por 15 min e lavagem por 2 min em PBS. Seguindo o tratamento com proteinase, as secções foram imersas em tampão TDT (Trisma base 30mM, cacodilato de Sódio 140mM e Cloreto de Cobalto 1mM, pH 7,2). O kit para detecção de fragmentação do DNA “In situ Cell Death Detection Kit, AP” (Boehringer Mannheim; TUNEL assay) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Adicionou-se às lâminas contendo as secções, a *TUNEL reaction mixture* (solução de sondagem + solução enzimática do Kit) e incubou-se em câmara úmida por 60 min a 37°C. Após incubação, os cortes foram lavados em tampão TB (NaCl 300mM, Citrato de Sódio 30mM, pH 8,5) por 15 min a 37°C e finalmente lavados em PBS a temperatura ambiente. Os cortes referentes aos controles positivos foram tratados com DNase I 1mg/ml (MBI Fermentas) por 10 min, após permeabilização com proteinase K, para indução de fragmentação do

DNA (Gavrielli, 1992). Controles negativos foram incubados apenas com solução de sondagem. Meristemas inoculados e não inoculados seguiram todo o procedimento acima descrito.

3.5.5 Análise em microscopia

Cortes de meristemas de cacau sondados com TUNEL foram observados em microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert Germany 135, equipado com filtro FITC (450 - 500 nm de excitação e 515 - 565 nm de detecção) e câmera fotográfica. Núcleos TUNEL positivos fluoresceram verdes brilhantes, tornando possível a observação da fragmentação, sendo que a captura de imagens foi mais eficiente 5 dias após armazenamento das lâminas a -20°C . Imagens foram obtidas utilizando-se o filme KODAK Ultra ASA 400.

3.6. Coloração convencional de material botânico

Lâminas com cortes de meristemas de cacau foram desparafinadas com a utilização de Acetato de Butila, 2x a 60°C por 30 minutos cada, desidratadas seguindo uma série decrescente de etanol (100%, 90%, 80% (v/v)) por 5 min cada e coradas com Safranina. Foram imersas em etanol 70% e 60% por 5 min antes da coloração com Azul de Astra. Seguido deste corante, utilizou-se etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (v/v)) por 5 min cada, Acetato de Butila - Etanol 100% 1:3 (v/v) (10min), Acetato de Butila - Etanol 100% 1:1 (v/v) (10min), Acetato de Butila - Etanol 100% 3:1 (v/v) (10 min), Acetato de Butila absoluto (10 min) e finalmente mais uma vez Acetato de Butila absoluto (10 min). Lâminas coradas foram montadas com Bálsamo do Canadá e mantidas em estufa a 45°C até análise.

Análises e fotografias dos cortes em lâminas foram realizadas em microscópio óptico Olympus BX 50. Imagens foram adquiridas com a utilização do filme Fujicolor Superia ASA 100.

3.7 Ensaio da tolerância de *Crinipellis pernicioso* a doses crescentes de peróxido de hidrogênio *in vitro*

Discos de micélio de 1 cm de diâmetro crescidos em meio sólido, (Glicose 1% (p/v), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,1% (p/v), KCl 0,02% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02% (p/v), CuSO_4 0,005% (p/v), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), Agar 1,5% (p/v), foram transferidos para placas de Petri com 25 ml de meio necessário para seu crescimento micelial, com acréscimo de solução de Peróxido de Hidrogênio 30% (Pro-Analysis) em diferentes concentrações (0,1M, 0,2M, 0,5M, 1M, 1,5M, 2M, 4M, 6,4M, 8M). Após inoculação, as placas foram mantidas em BOD a 24°C. Como controle negativo, cresceu-se micélio de *Crinipellis pernicioso* em meio sólido sem Peróxido de Hidrogênio. O desenvolvimento do crescimento do fungo foi acompanhado durante 18 dias após montagem do experimento. Medidas do aumento do diâmetro micelial, que representa crescimento deste organismo em placa, foram feitas 10, 16 e 18 dias após a inoculação, com auxílio de régua padrão. Esses dados foram posteriormente colocados em tabelas e convertidos em gráficos para análise.

3.8 Análise do perfil de expressão de genes envolvidos em PCD em biblioteca da interação compatível Cacau x *Crinipellis pernicioso*

Como parte de um projeto maior do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, que estuda a genômica da interação cacau-*C. pernicioso*, plântulas de cacau suscetíveis (Catongo) e resistentes (TSH1188) à doença vassoura de bruxa foram

cultivadas na estufa do CEPEC/CEPLAC e inoculadas como descrito em Frias *et al.*, 1995. Plantas controle, sem inoculação, foram também cultivadas. Os meristemas das plantas controle e inoculadas foram colhidos a partir do tempo zero até 80 dias após a inoculação (sintomas de necrose/presença de uma vassoura seca). As amostras foram armazenadas a -80°C , o RNA total foi extraído, misturado e utilizado para confecção de uma biblioteca de cDNA do ciclo de vida do fungo.

Existem diversos protocolos para isolar o RNA de plantas recalcitrantes (SCHNEIDERBAUER *et al.*, 1991; SCHULTZ *et al.*, 1994; BURGOS *et al.*, 1995; CHIMANZANERO-MANZANERO *et al.*, 2000; SUZUKI *et al.*, 2001) incluindo aqueles otimizados para plantas lenhosas (WANG *et al.*, 2000) e alguns estudos recentes que isolaram RNA de cacau (KOCHHAR *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2002; LALOI *et al.*, 2002). Entretanto, estes métodos usam gradiente de CsCl e ultracentrifugação resultando em baixo rendimento do RNA. Para solucionar esse problema, foi desenvolvido um procedimento eficiente para isolar RNA de órgãos de cacau infectados e não infectados por *Crinipellis perniciosa* (folhas, meristemas e frutos) (GESTEIRA *et al.*, 2003). Este novo protocolo usa Butanol terciário e elimina os problemas associados às contaminações por polifenóis e polissacarídeos.

A biblioteca de cDNA que correspondente à interação compatível entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis perniciosa* foi construída a partir de 3 μg de RNA total. Para tal utilizou-se o kit SMART cDNA CREATOR, conforme descrito pelo fabricante (Clontech). Os cDNAs foram clonados no plasmídeo pDNR-pDNR-LIB, eletroporado em células competentes Electromax 10 β (Invitrogen), utilizando-se um eletroporador MicroPulser Electroporator (Biorad). O seqüenciamento do DNA foi executado em um sequenciador capilar Megabace 1000 (Amersham Biosciences-GE Health-Care) seguindo-se os procedimentos padrão do laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UESC (VASCONCELOS *et al.*, 2003). Os eletroferogramas contendo as seqüências foram submetidos à bioinformática (<http://labbi.uesc.br>), analisados quanto a sua qualidade, utilizando-se o pacote Phred & Phrap (EWING & GREEN, 1998). As seqüências resultantes (ESTs) foram analisadas utilizando-se ferramentas de bioinformática para a anotação: determinação de ORFs (CARELS *et al.*, 2004), BLAST-X (ALTSCHUL *et al.*, 1997) automático contra o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

e contra o banco de dados do genoma do *Crinipellis pernicioso*
(<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>).

4. RESULTADOS

4. 1 Avaliação dos sintomas da doença

A sintomatologia produzida em plântulas de cacauero, decorrente da infecção por *C. perniciosa*, foi acompanhada e analisada em Casa de Vegetação (Figura 5a) após inoculação artificial. Observou-se homogeneidade entre os sintomas apresentados em diferentes plantas.

Vinte dias após a inoculação apareceram os primeiros sintomas, caracterizando-se pela murcha e necrose de alguns folíolos, assemelhando-se a uma resposta de hipersensibilidade (Figura 5c). Os primeiros inchamentos, acompanhados de formação de vassouras axilares, foram observados 45 dias após inoculação (Figura 5d). O secamento dessas vassouras teve início aproximadamente aos 2 meses após inoculação (Figura 5e), chegando ao estágio terminal após 90 dias. As vassouras em estágio terminal mudaram a coloração de verde para amarronzado e suas folhas secaram e tornaram-se quebradiças (Figura 5e). Plântulas não inoculadas não apresentaram nenhum destes sintomas (Figura 5b).

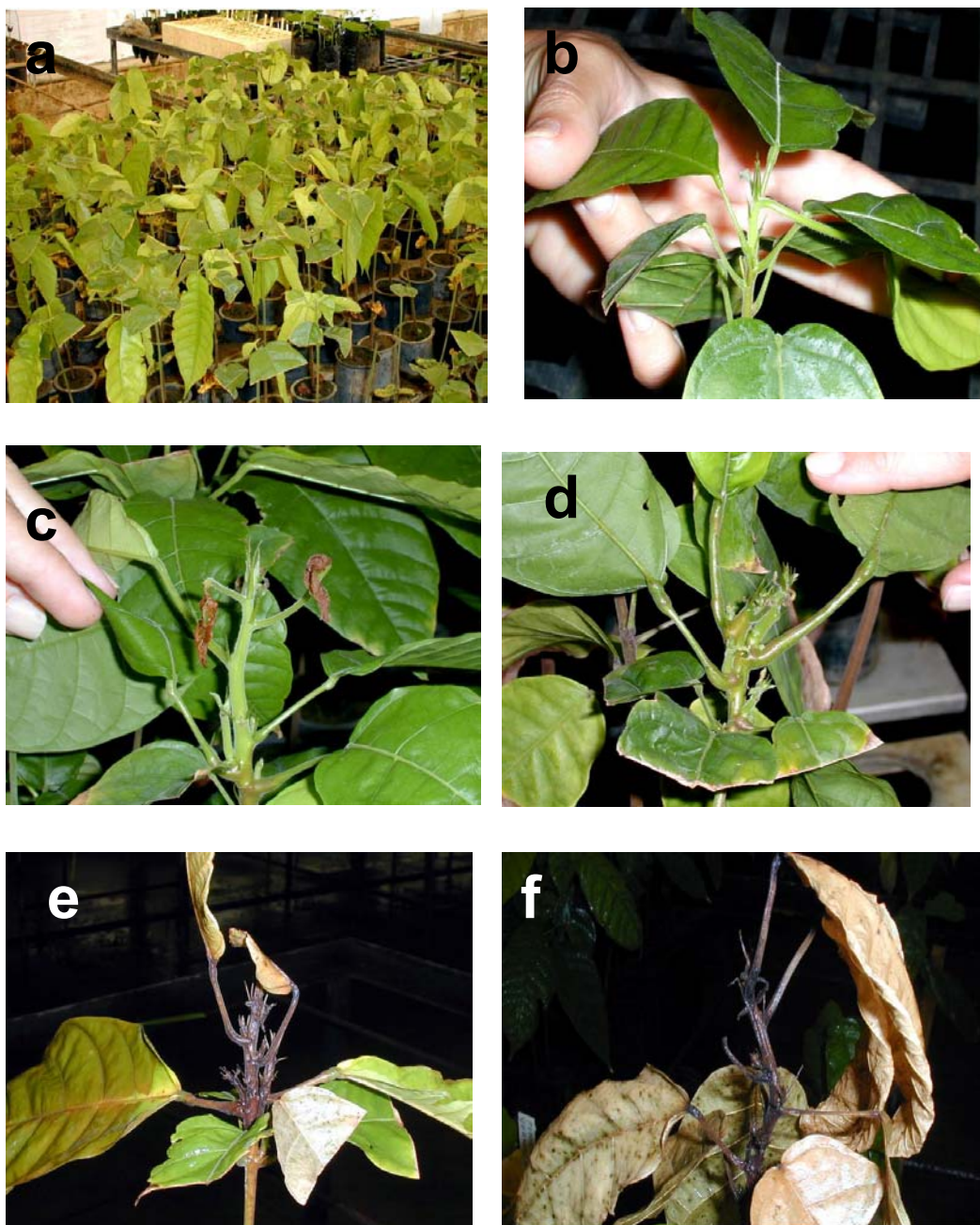


Figura 5. Plântulas de *Theobroma cacao*: a - visão geral da Casa de vegetação CEPEC/CEPLAC-Ilhéus-BA, b- plântulas não inoculadas, c- sintomas iniciais 30 dias após inoculação artificial com esporos de *Crinipellis pernicioso*, murcha e necrose dos folíolos , d- vassouras terminais e axilares 45 dias após inoculação, e- formação de vassouras secas 60 dias após inoculação, f- vassouras secas em estágio terminal 90 dias após inoculação.

4. 2 Detecção de fragmentação do DNA pela análise de TUNEL (TdT- mediated dUTP nick end labelling).

Esta técnica foi utilizada para detectar a ocorrência de fragmentação do DNA em regiões meristemáticas de cacaveiro durante o desenvolvimento da vassoura de bruxa. A análise de TUNEL revela grupos 3' OH acumulados por conta desta fragmentação (Gavrielli *et al.*, 1992). A intensidade da fluorescência foi indicativa da sondagem dos fragmentos.

Secções de tecido não inoculado não apresentaram núcleos TUNEL positivos (Figura 6a). Em secções de tecido meristemático, analisados após 60 dias (Figura 6c) e 90 dias (Figura 6d) de inoculação, núcleos TUNEL positivos apresentando fluorescência verde brilhante foram detectados.

O número de núcleos TUNEL positivos observados no estágio terminal do desenvolvimento da doença foi mais acentuado se comparado com o número observado após 60 dias de inoculação, indicando uma mais severa fragmentação após 90 dias. Adicionalmente, pudemos observar uma progressão de deformação nuclear. Pectinase e celulase foram utilizadas para possibilitar a penetração dos reagentes para sondagem, sendo que em algumas poucas células ainda foi possível observar-se o envoltório celular (Figura 6e).

Em células tratadas com DNase I (controles positivos) inúmeros núcleos fluorescentes foram observados, conforme esperado. Sendo estes indicativos de extensa fragmentação nuclear causada pela atividade de nuclease da DNase I (Figura 6b).

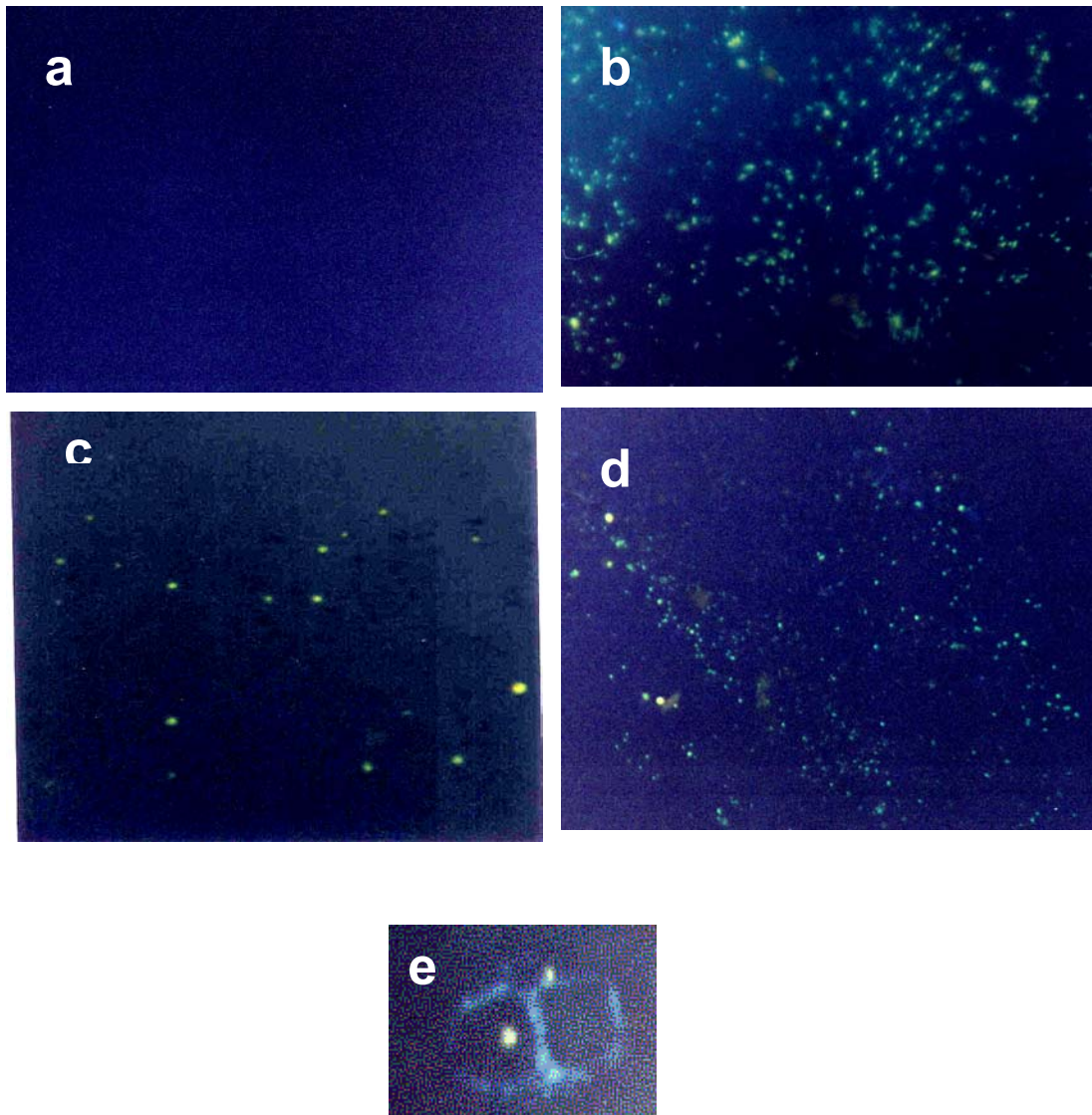


Figura 6. Análise de secções de tecido meristemático de *T. cacao* por meio da técnica de TUNEL: a- tecido meristemático não inoculado, b- tratado com DNase (controle positivo), c - 60 dias após inoculação com esporos de *Crinipellis pernicioso*, d- 90 dias após inoculação, e- evidência de alguns contornos celulares remanescentes.

4.3 Análise de fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose

Meristemas de cacaueteiro infectados e não infectados com *Crinipellis pernicioso* foram coletados no campo do CEPEC-CEPLAC (Ilhéus-BA), em diferentes estágios do desenvolvimento da doença para extração de DNA genômico. A análise da integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

Células de meristemas não infectados não apresentaram qualquer sinal de degradação do DNA (Figura 7, linha 1). Em contraste, DNA de meristemas infectados mostraram um significativo grau deste processo, salientando que se pôde observar um progresso na degradação diretamente relacionado ao desenvolvimento dos sintomas da doença (Figura 7). No estágio final de formação de vassoura seca observou-se severa degradação (Figura 7-linha 4).

4.4 Detecção de cristais de Oxalato de Cálcio e deposição de compostos fenólicos.

Um acúmulo de cristais de Oxalato de Cálcio intracelulares foi claramente evidenciado nas análises histológicas em cortes de tecido de cacaueteiro 45, 60 e 90 após dias a inoculação (Figura 8). A presença destes cristais foi acentuada com o avanço da doença, sendo que AOS 90 dias de observação o número de células contendo cristais mostrou-se bem superior nos campos analisados (Figura 8e). Em contraste, não foi observada formação destes em tecido não infectado (Figuras 8a e 8b). Visão detalhada do cristal intracelular pode ser observada nas figuras 10 e 11.

A deposição de compostos do tipo fenólicos fica evidenciada pela formação de microvacúolos, e pôde ser visualizada em tecidos não infectados e infectados (Figura 9).

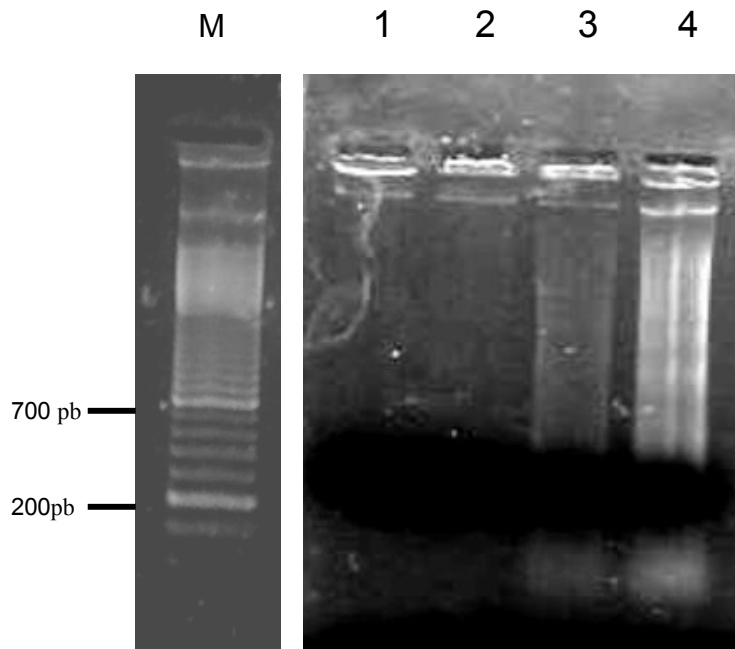


Figura 7. Análise da degradação do DNA de tecido meristemático de cacauero, observada em gel de agarose 1%, durante o desenvolvimento do sintoma da doença vassoura-de-bruxa. M-marcador 100 pb, 1-meristema não infectado campo, 2- estágio inicial formação de vassoura verde, 3- estágio inicial de formação de vassoura seca, 4- estágio terminal formação de vassoura seca.

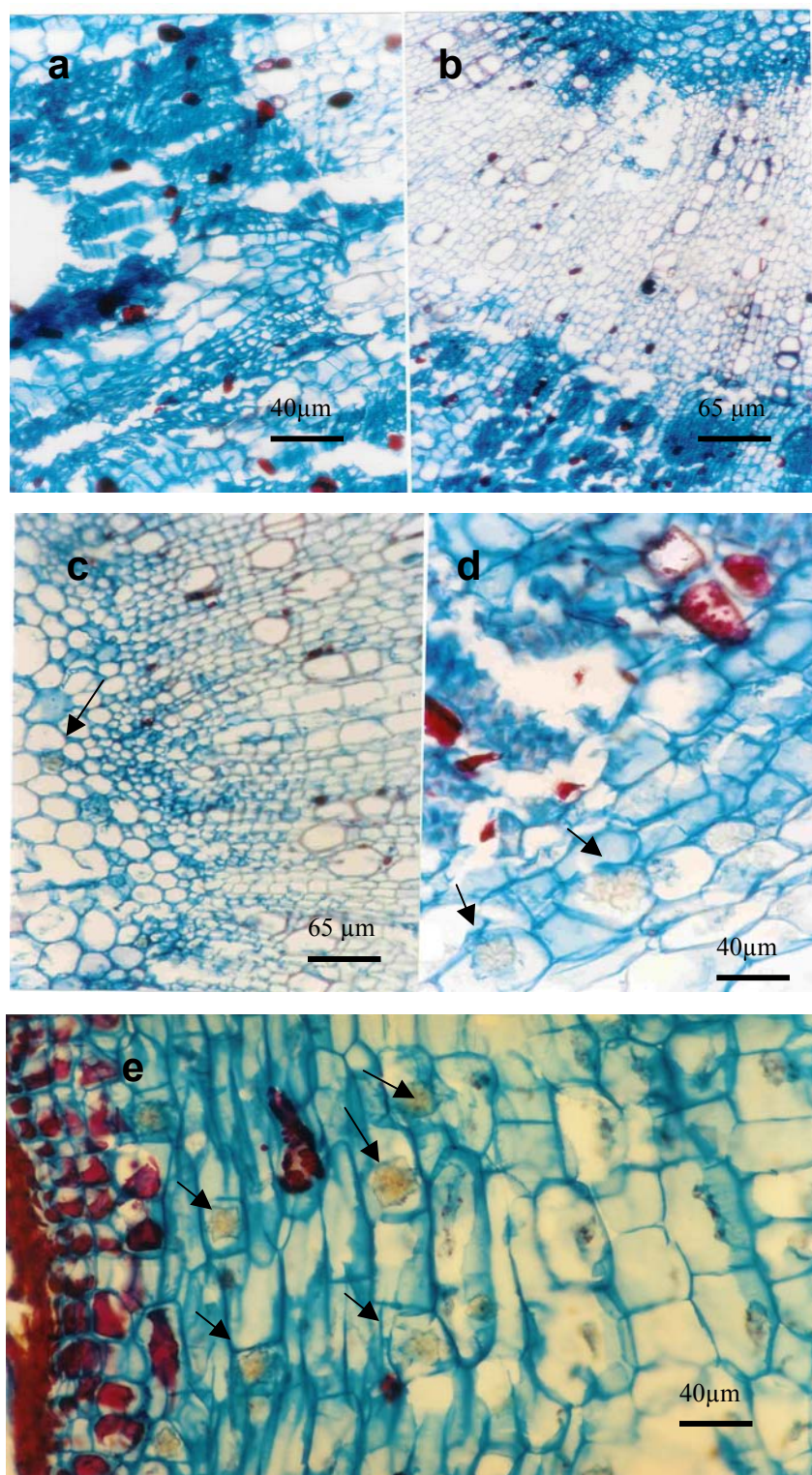


Figura 8. Detecção de cristais de Oxalato de Cálcio (Drusas) em secções de tecido de cacauero. a e b- não inoculado, c - 45 dias após inoculação , d- 60 dias após inoculação, e- 90 dias após inoculação. As setas indicam algumas drusas.

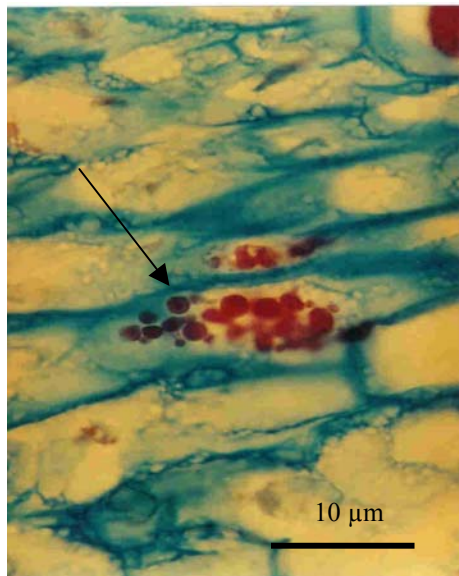


Figura 9. Formação de microvacuólos de compostos fenólicos em plantas inoculadas

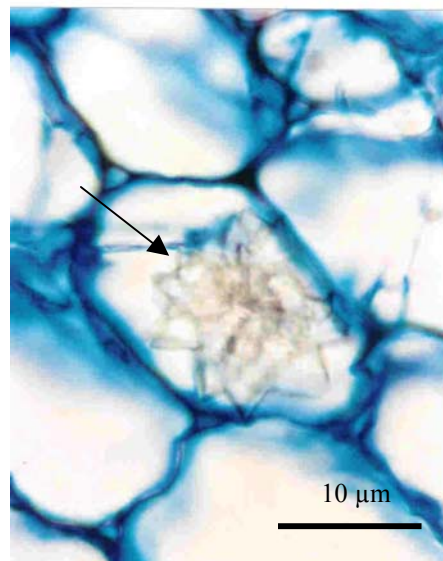


Figura 10. Visão detalhada cristal de Oxalato de Cálcio de compostos fenólicos em plantas inoculadas.

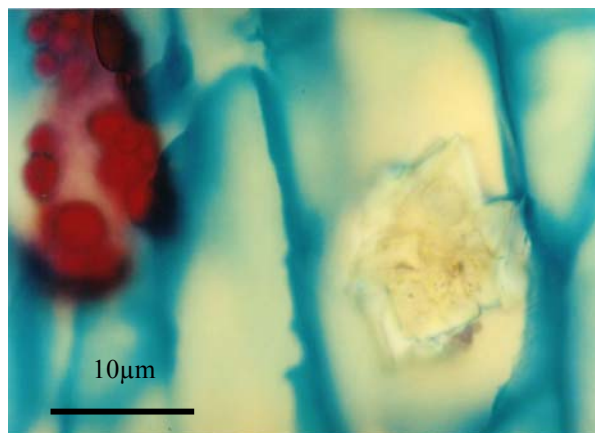


Figura 11. Visão detalhada de cristal de Oxalato de Cálcio e microvacuólos de compostos fenólicos em plantas inoculadas.

4.5 Análise dos efeitos do H₂O₂ sobre o crescimento micelial de *Crinipellis perniciosa*

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um dos principais componentes da explosão oxidativa, sendo dessa forma capaz de causar sérios danos às células por sua toxicidade. Os efeitos de diferentes concentrações de H₂O₂ no crescimento de micélio de *Crinipellis perniciosa* foi testado neste trabalho. Este fungo mostrou-se bastante tolerante a altas concentrações de H₂O₂, chegando a se desenvolver em meio contendo 8M desta espécie Oxigênio reativa. No experimento controle, micélio de *Crinipellis* crescido em meio sólido sem a presença de Peróxido, o micélio desenvolveu-se extensivamente, alcançando o seu limite de crescimento no 19º dia (Figuras 12 e 13). Os micélios submetidos a concentrações crescentes de H₂O₂ tiveram crescimento um pouco mais lento, sendo inversamente proporcional à concentração de H₂O₂ (Figura 14). O desenvolvimento do micélio crescido em baixas concentrações de H₂O₂ não sofreu grande alteração se comparado ao experimento controle (Figuras 12 e 13).

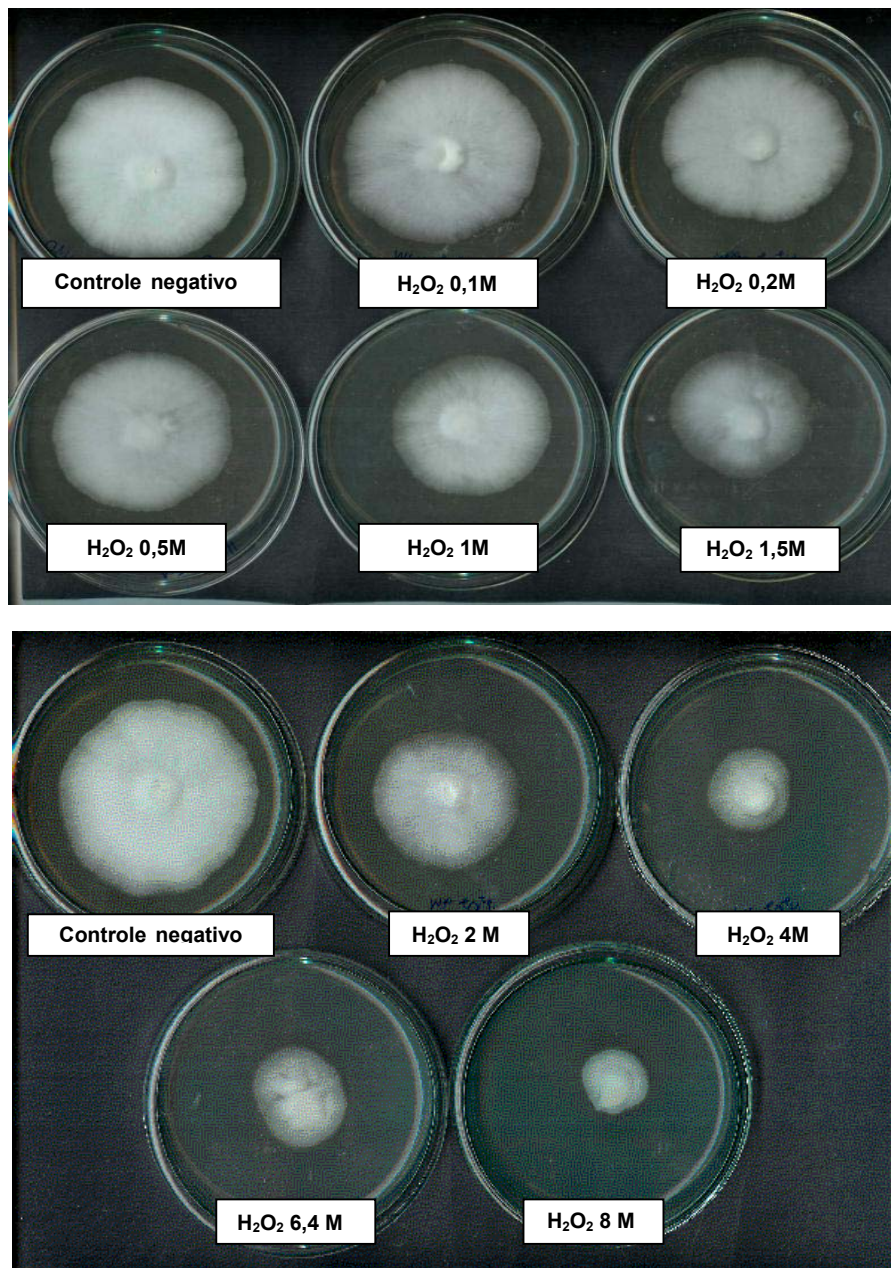


Figura 12. Crescimento de *Crinipellis perniciosus* em meio de cultura sólido, contendo concentrações crescentes de H_2O_2 . 10 dias após inoculação.

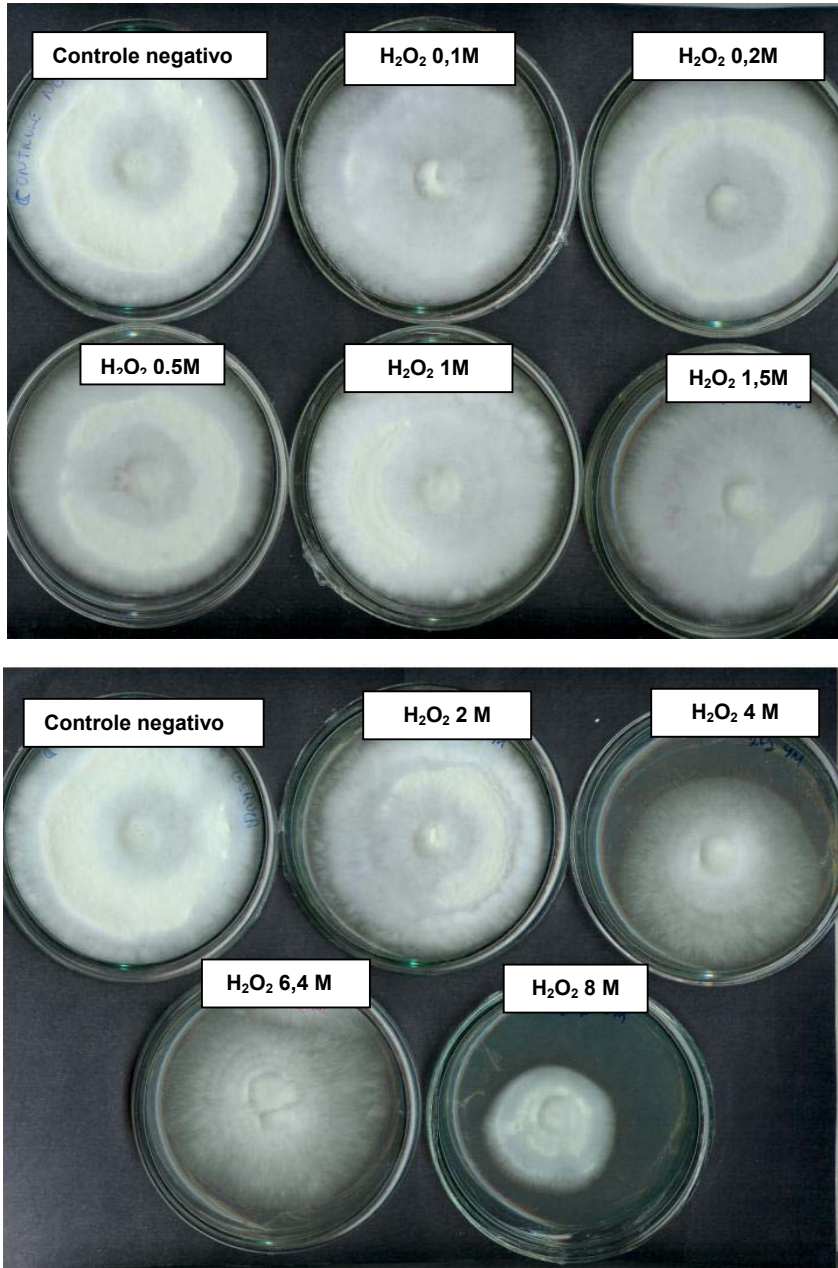


Figura 13. Crescimento de *Crinipellis perniciosus* em meio de cultura sólido, contendo concentrações crescentes de H₂O₂. 18 dias após inoculação.

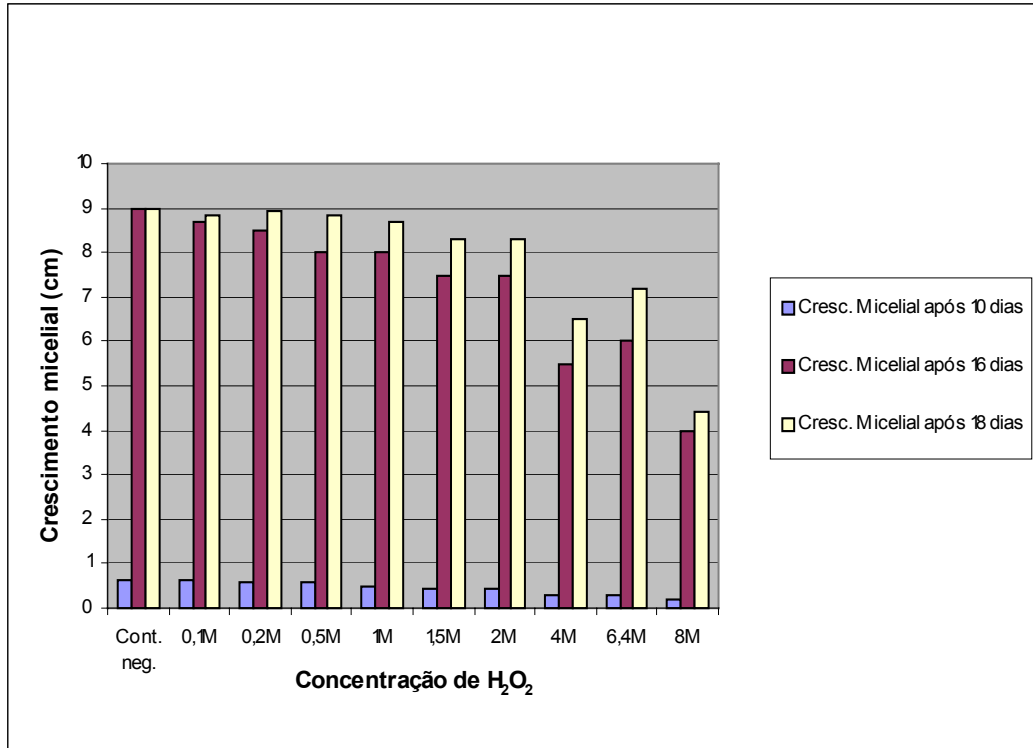


Figura 14. Efeito de diferentes concentrações de H₂O₂ sobre crescimento micelial de *Crinipellis perniciosus*. Medidas das médias dos diâmetros miceliais (2 sentidos) foram efetuadas 10, 16 e 18 dias após inoculação. ■ 10 dias, ■ 16 dias, ■ 18 dias.

4.6 Análise do perfil de expressão da biblioteca da interação compatível Cacau x *Crinipellis pernicioso*

Por meio da análise do perfil de expressão dos genes da biblioteca da interação compatível Cacau x *C.pernicioso*, foram identificadas seqüências de genes relacionadas com variados eventos metabólicos geradores de sinais que fazem parte do mecanismo molecular de PCD em plantas. Estas incluem genes associados com estresse oxidativo, como Superóxido dismutase, glutathione S transferase, peroxidase, oxalato oxidase; degradação protéica, como Inibidor do proteasoma e cisteína proteinase e genes diretamente relacionados ao evento como para proteína relacionada a apoptose (Tabela 3).

Tabela 3. Genes relacionados à morte celular programada identificados na biblioteca da interação compatível cacau x *Crinipellis pernicioso*

ACESSO	GENES	E value	RELAÇÃO
UE-SP-P08-B02	Calmodulina	5e-37	Transmissão de sinal
UE-SP-P13-A09	Glutathione S transferase	2e-35	Estresse oxidativo
UE-SP-P08-G05	ATPase transportadora de Cálcio	1e-32	Transmissão de sinal
UE -SP-P25-C08	Cisteína proteinase (caspase) induzida por estresse	9e-09	Degradação proteica
UE-SP-P09-H07	Germina (oxalato oxidase)	3e-44	Estresse oxidativo
UE- SP-P08-D04	Proteína relacionada a apoptose	4e-23	Morte celular
UE- SP-P09-G02	Superóxido dismutase	9e-14	Estresse oxidativo
UE-SP-P09-E06	Peroxidase	1e-25	Estresse oxidativo
UE- SP-P09-G01	Inibidor do proteassoma	9e-20	Degradação protéica – Início da PCD

5. DISCUSSÃO

5.1 Fragmentação do DNA em *T. cacao* induzida por *Crinipellis pernicioso*

Os estudos voltados para descobertas de ocorrência de PCD em plantas tornaram possível a caracterização de determinados traços celulares diagnósticos deste evento celular já claramente identificados em animais. Um dos mais caracterizados processos decorrente da morte celular é o processo de fragmentação do DNA, que já foi evidenciado em células de plantas submetidas a diversificadas situações, tais como mudanças ambientais (PEDROSO & DURZAN, 2000), estresse citotóxico (NING *et al*, 2001; RYERSON & HEATH, 1996), estresse mecânico (GARCÊS *et al*, 2001), ataque por patógenos (RYERSON & HEATH, 1996), bem como em processos de ocorrência natural durante o desenvolvimento de plantas, tal como senescência (COUPE *et al*, 2004) e formação de elementos traqueais (DREW *et al*, 2000). A detecção da fragmentação do DNA é de grande relevância na caracterização de possíveis eventos de PCD.

A técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase- mediated dUTP nick end-labelling) é bastante sensível para esta finalidade, sendo um método direto e específico de sondagem de quebras no DNA, além de possuir outras vantagens como a capacidade de detecção da fragmentação em nível de células individuais (GAVRIELLI *et al*, 1992). Neste trabalho utilizou-se esta metodologia com intuito de caracterizar o processo de degradação celular desencadeado durante o processo de infecção de tecidos de *T. cacao* por *C.pernicioso*.

O presente estudo fornece evidências que ocorre um processo de morte celular em *Theobroma cacao* induzido em resposta à infecção por *Crinipellis pernicioso*, sendo

que há um aumento gradativo deste evento durante o desenvolvimento da doença (Figuras 6 e 7). Danon *et al.* (2000) propõe que há um padrão de fragmentação nuclear em células de planta sofrendo apoptose, podendo ser dividido em três estágios: forma arredondada, forma crescente e fragmentada. Nossas análises demonstram um padrão diferencial de fragmentação nuclear entre o 60º e o 90º dias de infecção, sendo que há um maior número de núcleos TUNEL positivos na análise de secções do 90º dia e que estes núcleos se mostraram mais fragmentados que nos de menor número observados no 60º dia de infecção (Figura 6). Esses resultados corroboram com os sintomas de necrose observados nos ramos infectados (vassouras secas) (Figura 5).

O padrão de DNA ladder com fragmentos que variam em 180-200 pares de bases é um dos traços característicos de morte celular em plantas e tem sido identificado em certas rotas de PCD (LILJEROTH & BRYNGELSSON *et al.*, 2002; NING *et al.*, 2002; VEIT *et al.*, 2001; RYERSON & HEATH, 1996), apesar destes fragmentos de tamanho definido não apresentarem este padrão em muitas células animais (McCABE *et al.*, 1997). Em alguns casos, tem sido demonstrado que a ocorrência de PCD em um número reduzido de células inviabiliza a detecção do ladder por eletroforese em gel de agarose, sendo que a utilização de metodologias mais sensíveis à detecção de fragmentação é capaz de demonstrar a sua ocorrência em células individuais (McCABE *et al.*, 1997).

A presente análise de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose foi consistente com o resultado de fragmentação obtido pelo TUNEL, sendo possível diagnosticar um padrão de degradação do DNA claramente crescente ao longo do desenvolvimento da doença (Figura 7), sendo que em células de meristemas não infectados não houve qualquer indício de fragmentação do DNA (Figura 7, linha1). Apesar desta constatação, a fragmentação observada não seguiu o padrão de ladder na maioria das análises e em algumas poucas observações, onde as bandas correspondentes aos fragmentos múltiplos de 200 pb foram visíveis, estas não puderam ser nitidamente demonstradas. O rastro detectado por gel de agarose pode ocorrer devido à formação de fragmentos randômicos decorrentes de uma degradação não específica. Esta diferença pode resultar do tempo de clivagem de proteínas nucleossomais (MITLER, 1998) ou na clivagem do DNA por endonucleases que não

clivam em sítios regulares no DNA (MITTLER & LAM, 1995) não levando a fragmentos de DNA tamanho específicos.

Schwartz *et al* (1993) sugerem que haja mais de uma via para mediar a PCD e que a ativação preferencial está diretamente ligada ao tipo de estímulo desencadeador do processo. Tratamento de células vegetais com determinados químicos, tal como KCN leva a formação de ladder, já em tecidos tratados com H₂O₂ não há ocorrência de ladder, corroborando com a sugestão que este está associado com certos tipos de morte celular e parece estar relacionado com o modo de ação do desencadeador do evento (RYERSON & HEATH, 1996). Pasqualini *et al* (2003) observaram que o tratamento de células de tabaco com ozônio levou à morte celular, sendo possível sua detecção por meio da técnica de TUNEL, porém os fragmentos gerados não apresentaram padrão de ladder. Adicionalmente, em células de cenoura sofrendo morte celular programada, um reduzido bandeamento do DNA foi observado após indução por choque térmico, assim como ocorrido no presente trabalho. Nenhum bandeamento específico foi observado após tratamento com H₂O₂ (McCABE *et al.*, 1997). A ocorrência de ladder parece não ser um evento inevitável em PCD, sendo que não tem sido demonstrada em alguns casos de morte celular (SCHWARTZ *et al*, 1993; PANAVAS *et al.*, 2000).

5. 2 Células de cacau em processo de PCD acumulam cristais de oxalato de cálcio (drusas): possível envolvimento nos processos de morte celular

Recentes estudos em animais têm demonstrado que o oxalato de cálcio em altas concentrações é tóxico para as células, podendo levar a morte celular (MILLER *et al.*, 2000; SARICA *et al*, 2001; HSIEH *et al*, 2003; MIYAZAWA *et al*, 2004). A morte celular desencadeada por oxalato em células epiteliais dos rins exhibe características de morte celular apoptótica, tais como clivagem do DNA, crescimento do número de corpos apoptóticos e expressão de genes ligados a este processo. A superexpressão do gene antiapoptótico *bcl-2* conferiu proteção para toxicidade do oxalato evidenciando ainda mais a indução de apoptose pelo oxalato (MILLER *et al.*, 2000).

O evento de morte celular é desencadeado pelo crescimento do estresse oxidativo e por alterações na permeabilidade da membrana (MILLER *et al*, 2000) podendo contribuir com algumas patologias renais, tais como regressão renal e Hiperoxaluria (altos níveis de oxalato na urina). O excesso de Oxalato, juntamente com a formação de cristais de Oxalato de Cálcio tem uma participação crítica no processo de formação dos cálculos renais, induzindo danos a células dos rins que podem culminar em morte celular (MIYAZAWA *et al*, 2004; SARICA *et al*, 2001). O oxalato é capaz de causar injúria às células não só pela formação de Cristais, mas também pela capacidade de levar a formação de espécies Oxigênio Ativas. Segundo Hsieh *et al* (2003) proteína Tamm-Horsfall capaz de proteger células renais da produção de radicais livres foi capaz de evitar a morte celular em células de rins expostas ao Oxalato.

Em nosso estudo experimental observou-se a presença de Cristais de Oxalato de Cálcio em células de secções de tecido de cacauero infectados por *Crinipellis pernicioso*, assim como observado em células de animais. Cortes anatômicos comprovaram a infecção tecidual (dados não mostrados). Um acúmulo crescente de cristais de Oxalato de Cálcio foi observado ao longo do desenvolvimento da doença, sendo que no estágio terminal de degeneração tecidual (90 dias) foi observada uma maior concentração de cristais por área. Não foi evidenciada deposição de cristais de Oxalato de cálcio nas células de tecido não inoculado (Figura 8). Cristais de Oxalato de Cálcio ocorrem em muitas espécies de plantas e podem vir a ser uma forma de remoção do Oxalato que se acumula em quantidades tóxicas nas células. O oxalato pode estar em forma de sal solúvel ou cristais insolúveis de Oxalato de cálcio.

Por conta do reduzido número de trabalhos existentes em plantas voltados para a formação de cristais de Oxalato, pouco se sabe sobre a sua provável função no processo de PCD. As vias do Glioxilato e o ácido ascórbico parecem ser as principais precursoras de Ácido Oxálico em plantas, sendo que outras vias têm sido investigadas. O papel do ácido oxálico no equilíbrio iônico celular tem sido reportado sendo que altas concentrações de Cálcio parecem influenciar a produção de Oxalato, levando a uma ativação da sua biosíntese (FRANCESCHI & HORNER, 1980).

Austenfeld & Ladder (1978) demonstraram que em *Salicornia europaea* o crescimento dos níveis intracelulares de Cálcio levou a formação de Oxalato de Cálcio, sendo que em baixas concentrações de Cálcio o Oxalato se manteve na sua forma solúvel (FRANCESCHI & HORNER, 1980). Muitos processos celulares são regulados pelas variações dos níveis de Cálcio citoplasmático, onde este pode ativar uma série de proteínas levando a variadas respostas celulares. Alterações nas concentrações de Cálcio citoplasmático têm sido observadas devido ao influxo de Cálcio através da membrana em resposta a invasão por patógenos (GELLI *et al.*, 1997). O influxo de Cálcio é um das principais características observadas em células sofrendo morte celular programada. Este íon é capaz de ativar uma série de enzimas envolvidas em PCD, tais como Kinases, endonucleases, fosfatases, calmodulinas, entre outras.

Este trabalho sugere que o influxo intenso de Cálcio para o citoplasma desencadeado pela infecção do *Crinipellis pernicioso* nas células de cacau pode levar ao seu acúmulo, e conseqüente deposição em forma de cristais de Oxalato de Cálcio intracelulares. Possivelmente o Cálcio pode vir a induzir a biosíntese de Oxalato, como já descrito. A formação de cristais de Oxalato em células de plantas pode funcionar na remoção do Cálcio excedente (FRANCESCHI & HORNER, 1980). Dessa maneira, não pode ser considerado um processo de simples precipitação, mas sim resultado de alterações iônicas induzidas por estresse, tal como invasão por patógenos. O acúmulo de Oxalato de Cálcio nunca foi descrito em células vegetais sofrendo PCD, diferentemente do observado para animais, sendo essa a primeira evidência biológica desse evento para plantas em processo de PCD.

A expressão de genes relacionados com a formação de H_2O_2 tem sido identificada em células de plantas sofrendo PCD. A germin oxalato oxidase tem grande importância na produção de H_2O_2 em espécies de plantas produtoras de Oxalato, por ser responsável pela conversão de Oxalato e O_2 em H_2O_2 e CO_2 (Figura 15). Sua expressão pôde ser observada em gramíneas em processo de senescência contendo oxalato (DEUNFF *et al.*, 2004), assim como em *Arabidopsis thaliana* em processo de morte celular induzida pela toxina AAL de *Alternaria alternata* (GECHEV *et al.*, 2004). Em girassol, sua superexpressão levou a intensa degradação de oxalato, geração de altos níveis de H_2O_2 e ativação de genes de defesa (HU *et al.*, 2003).

No perfil de expressão da biblioteca de interação Cacau x *C. pernicioso* foi identificada uma oxalato oxidase (OXO; EC 1.2.3.4), como observado na tabela 3, o que sugere que o Oxalato acumulado na célula também pode estar sendo convertido pela ação da oxalato oxidase em H₂O₂. Esta molécula sinalizadora está reconhecidamente envolvida na explosão oxidativa e conseqüentemente em processos de morte celular. O peróxido de Hidrogênio pode ser originado não só por essa via, mas por distintas outras fontes celulares e pode ser fator determinante, juntamente com outras moléculas, do desencadeamento da PCD.

Recentemente, foi demonstrado que a resposta de plantas a patógenos conduz a uma alteração no padrão de expressão de genes envolvidos em muitos processos celulares básicos. Há uma conversão na expressão de genes mantenedores (*house keeping genes*) para expressão de genes relacionados à defesa. Esta conversão resulta da sinalização celular e de um aumento da demanda energética necessária a efetivas respostas de defesa contra a invasão. A análise do perfil dos transcritos ativados nestas situações permitiu a identificação de um crescimento no metabolismo de glioxilato não identificado anteriormente (SCHEIDELER *et al*, 2002). Analisando-se a via metabólica do glioxilato (Figura 16) (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>), observa-se que esta via é responsável pela síntese do oxalato.

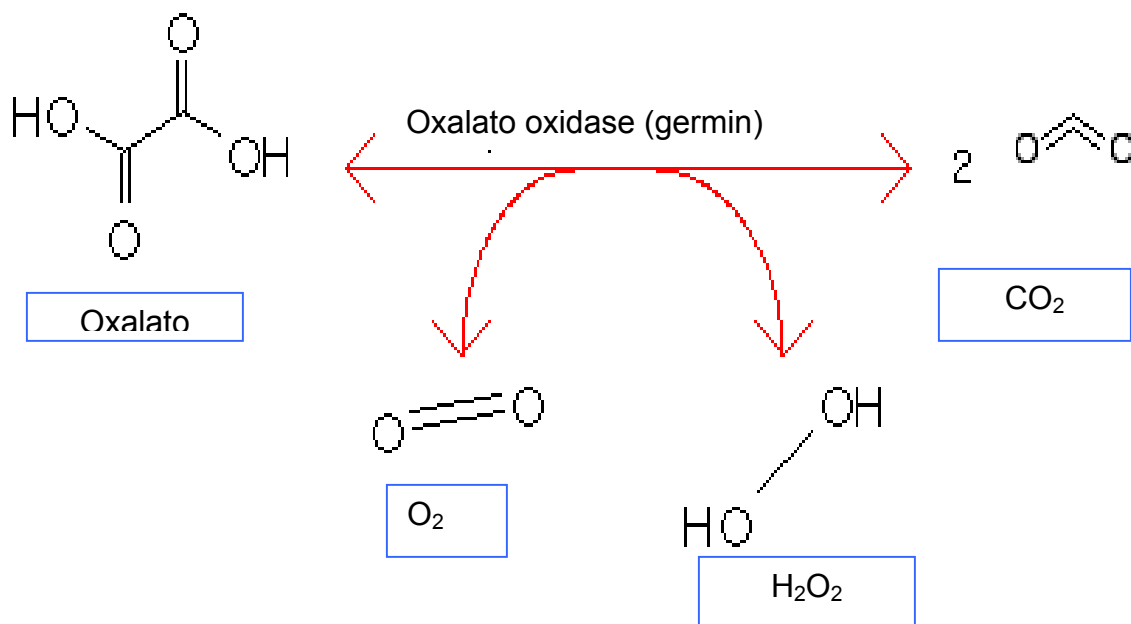


Figura 15. Reação enzimática de conversão do Oxalato em peróxido de hidrogênio pela Oxalato oxidase (germina).

Esta descoberta é particularmente interessante diante das observações de formação de cristais de oxalato de cálcio nas células de cacau infectadas por *C. pernicioso*. Os resultados aqui apresentados podem também ser um indício do aumento do metabolismo do glioxilato, principal precursor do Oxalato (Figura 16). Adicionalmente, a biblioteca da interação compatível apresenta genes envolvidos na homeostase celular de cálcio e metabolismo do glioxilato (Tabela 3). Com a descoberta das germinas de trigo (LANE *et al.*, 1993), os cristais de oxalato de cálcio passaram a ser considerados como uma fonte dinâmica de H_2O_2 , o qual, em diferentes concentrações pode mediar a sinalização para o desenvolvimento de respostas de defesa em vegetais, conseqüentemente não sendo considerados compostos celulares estáticos (LANE, 2000).

Adicionalmente, a quebra do oxalato de cálcio, além de liberar H_2O_2 , libera Ca^{2+} , que é reconhecidamente um cofator de várias enzimas envolvidas no processo de morte celular, tais como nucleases, caspases, calmodulinas, entre outras (BLUMWALD

et al., 1998). O influxo de Cálcio citossólico é induzido após tratamento com elicitores que levam ao desencadeamento de uma série de respostas celulares (LECOURIEUX *et al.*, 2002; BLUME *et al.*, 2000; GELLI, 1997), além disso, a retenção do seu fluxo pode inibir a morte celular programada (LI *et al.*, 2004). Com isso, sugere-se neste trabalho que o oxalato de cálcio possa atuar de pelo menos duas formas distintas no processo de PCD no cacau.

A biblioteca da interação compatível apresentou sequências de transportadores de Cálcio (Tabela 3) além de um número significativamente alto de seqüências de calmodulina (o dobro quando comparada com a interação incompatível), proteína de ligação ao Cálcio, sugerindo que ela é altamente expressa nesse patossistema (dados não mostrados). Sabe-se que a calmodulina é induzida em função do acúmulo de H₂O₂, (DESIKAN *et al.*, 2001), e que os níveis de cálcio intracelulares aumentam durante o estresse oxidativo (PRICE *et al.*, 1994; LECOURIEUX *et al.*, 2002). De acordo com esses resultados, KEATES *et al.* 2003 observaram um acúmulo de transcritos de calmodulina após a infiltração de *A. thaliana* por Nep1 de *F. oxysporum*.

Resta-nos compreender porque as plantas acumulam oxalato de cálcio em resposta a infecção por patógenos. Provavelmente trata-se de um mecanismo altamente conservado de resposta a uma gama de estresses (bióticos e abióticos) em plantas e animais (HOEBERICHTS & WOLTERING, 2003). E no caso de patógenos que co-evoluíram com seus hospedeiros, esse fato pode contribuir para desencadear a PCD, favorecendo, conseqüentemente, o processo de colonização.

5. 3 *Crinipellis perniciosa* tolera ambientes altamente oxidativos

A produção de espécies Oxigênio ativas é muito observada em plantas sofrendo ataque por patógenos, como alternativa para intoxicar a célula e inibir a dispersão do invasor. Evidências crescentes sugerem que a morte celular induzida por toxinas e elicitores partilhe similaridade com PCD de animais. A presença de alguns elicitores fúngicos em interações planta patógeno podem vir a induzir a explosão oxidativa levando a morte celular (JENNINGS *et al*, 2001; VEIT *et al*, 2001). Este evento na maioria das interações conhecidas é considerado um mecanismo de defesa desencadeado pelo hospedeiro, porém em alguns casos promove o desenvolvimento da doença, suportando a idéia que ROS podem promover a doença a depender do patógeno e do hospedeiro envolvidos.

Tratando-se de patógenos biotróficos, células vivas do hospedeiro devem ser requeridas para suportar o parasitismo obrigatório, porém fungos necrotróficos podem ativamente matar células do hospedeiro por meio da secreção de toxinas ou elicitores. Os estudos existentes indicam que proteínas denominadas indutoras de necrose, conservadas evolutivamente, em alguns casos, são capazes de causar um processo caracterizado como PCD em plantas (VEIT *et al.*, 2001), sendo que mais estudos de caracterização do processo desencadeado por estas moléculas são necessários para diagnosticar a indução de PCD.

Patógenos necrotróficos possivelmente podem desencadear o processo de PCD em células de plantas para permitir sua sobrevivência (QUTOB *et al.*, 2002). A detecção da expressão do indutor de *Phytophthora sojae*, patógeno hemibiotrófico, em tecido de soja infectada durante estágio mais tardio de infecção, ou seja, na transição de biotrófico para necrotrófico em interação compatível, sugere que esta proteína é um elicitor que acelera a morte celular em plantas dando início à fase necrotrófica do desenvolvimento da doença (QUTOB *et al.*, 2002; QUTOB *et al.*, 2000). É desconhecido como PsojNIP causa morte celular, mas parece manipular mecanismos de defesa do hospedeiro para levar a PCD (VEIT *et al.*, 2001).

Sendo *Crinipellis perniciosa* um patógeno hemibiotrófico, inicialmente se estabelece em células vivas, e assemelha-se a um patógeno necrotrófico nos estágios finais de infecção quando habita células mortas do cacau para sobrevivência. Um indutor de necrose, identificado na biblioteca de interação cacau x *Crinipellis perniciosa* e capaz de induzir necrose em plântulas de cacau após infiltração (MACEDO, 2004), pode ser possivelmente produzido, juntamente com outras proteínas, visando facilitar sua colonização no hospedeiro.

Fungos necrotróficos usam processos oxidativos para atacar e invadir tecidos de plantas. Estudos indicam que a liberação de espécies Oxigênio ativas, como H_2O_2 em eventos de morte celular são determinantes para colonização destes organismos. A geração da explosão oxidativa e conseqüente resposta hipersensível induzidas pela inoculação com *Botrytis cinerea* em *Arabidopsis*, não só não foi capaz de prevenir a sua dispersão, como também facilitou a colonização da planta (GOVRIN & LEVINE, 2000; MAYER *et al.*, 2001). Levando-se a crer que a HR é uma resposta eficiente contra organismos que necessitam de células vivas para sua sobrevivência. Desta forma, estes organismos são capazes de explorar um mecanismo de defesa do hospedeiro para acentuar sua patogenicidade. Para *Cladosporium fulvum*, concentrações mínimas de H_2O_2 foram capazes de inibir o crescimento fúngico e a germinação de esporos (LU & HIGGINS, 1999).

Por meio da análise dos efeitos da presença de H_2O_2 sobre o desenvolvimento micelial de *Crinipellis perniciosa*, constatou-se que o crescimento no meio contendo H_2O_2 deu-se mais lentamente que o observado no experimento controle (Figura 14) Apesar disso, *C. perniciosa* se mostrou bastante resistente ao H_2O_2 , sendo capaz de se desenvolver na presença de altas concentrações desta espécie Oxigênio ativa, assim como observado para *Botrytis cinerea* (GIL-AD & MAYER, 1999).

A habilidade de *B. cinerea* em resistir ou inativar H_2O_2 e se desenvolver em sua presença foi evidenciada e parece estar relacionada com a produção de enzimas necessárias a conversão de H_2O_2 . Foi demonstrado que necrotróficos contêm uma série de enzimas, que permitem colonizar o ambiente hostil do hospedeiro e remover ou inativar ROS. Entre as enzimas identificadas estão Superóxido dismutase, peroxidases, catalases, entre outras (MAYER *et al.*, 2001).

Na análise do genoma de *Crinipellis pernicioso* foi possível identificar genes responsáveis pela produção de enzimas que são capazes de remover ou inativar H₂O₂, como peroxidases e catalases. Diante desta constatação, sugere-se que a capacidade de *Crinipellis pernicioso* sobreviver em meio contendo altas concentrações de H₂O₂ pode ser decorrente da produção de enzimas necessárias à sua quebra, ou seja, *C. pernicioso* possivelmente possui mecanismos antioxidantes que permitem sua sobrevivência em ambientes oxidativos. Certamente outros estudos *in vivo* da participação do peróxido de Hidrogênio na interação cacau x *Crinipellis pernicioso* são requeridos.

A observação de microvacúolos de compostos fenólicos em células de tecido de cacau inoculado e não inoculado (Figura 9) evidencia que *T. cacao* é uma espécie rica em compostos fenólicos sob ocorrência natural, não tendo sido fenômeno induzido pela presença do patógeno. Este resultado corrobora com os dados bioquímicos observados por Scarpari *et al.* (2004) onde não foram observadas diferenças significativas nos teores de compostos fenólicos entre plantas de cacau inoculadas e controle. A análise do genoma do *C. pernicioso* evidencia uma série de genes envolvidos na degradação de compostos fenólicos e ligninas (Lacases). Isso pode explicar a insensibilidade desse fungo a esses compostos.

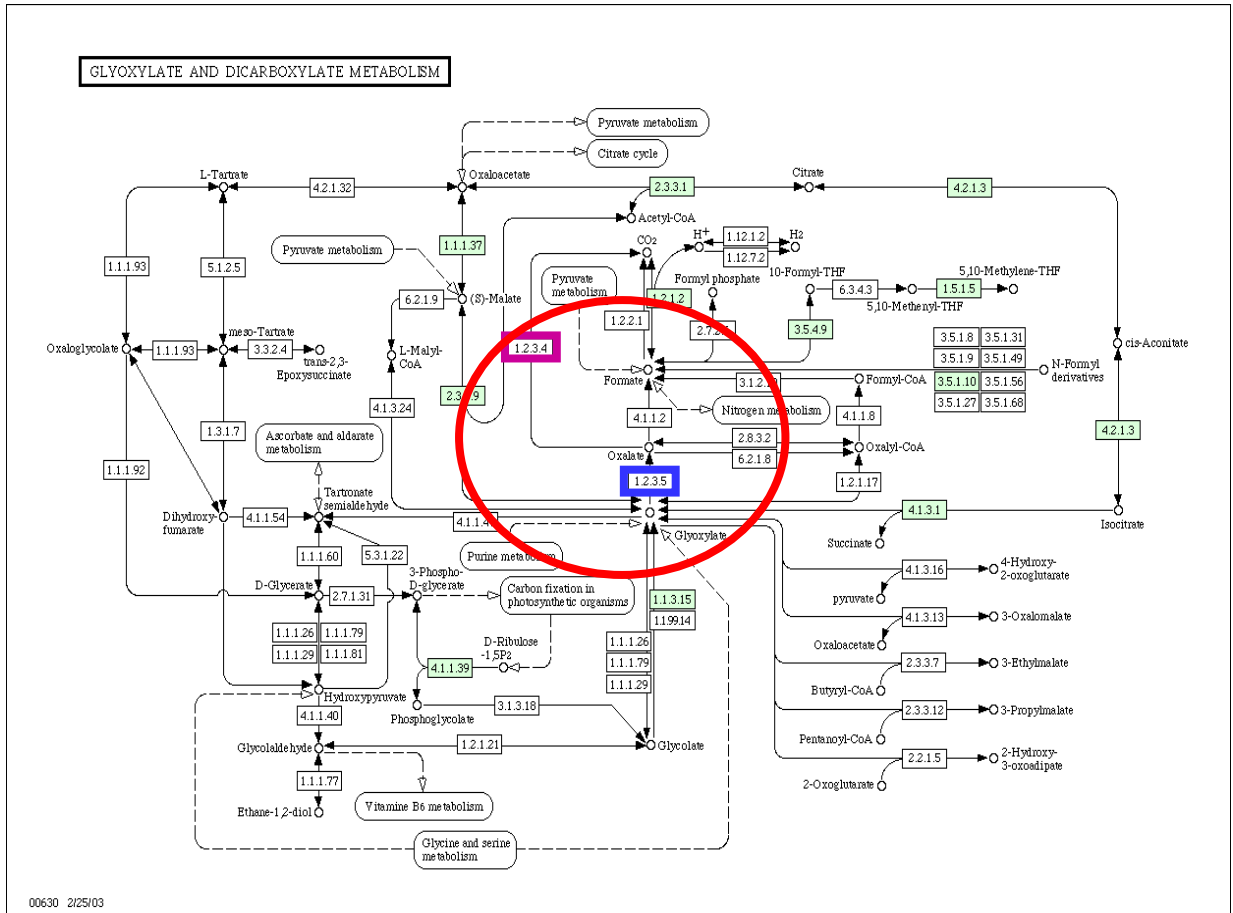


Figura 16. Metabolismo do glioxilato, Fonte : (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>).

6. CONCLUSÕES

- O processo infectivo de *Crinipellis pernicioso* no cacauero leva ao desencadeamento de um evento de morte celular programada.
- O fungo *Crinipellis pernicioso* é capaz de desenvolver-se em ambientes altamente oxidativos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, M. E.; PENNELL, R. I.; MEIJER, P. J *et al.* Reactive Oxygen intermediates mediate a Systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, v. 92, p. 773-784, 1998.

ALTSCHUL, STEPHEN F., THOMAS L. *et al.* "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p.3389-3402, 1997.

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M. M., CASCARDO, J. & FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 167-175, 1999.

ASAI, T.; STONE, J. M.; HEARD, J. E *et al.* Fumonisin B1 – induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires Jasmonate, Ethylene and Salicylate dependent signaling pathways. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1823- 1835, 2000.

BELL, E. & MULLET, J. E. Characterization of a *Arabidopsis* Lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1133-1137, 1993.

BERROCAL-LOBO, M., MOLINA, A. & SOLANO, R. Constitutive expression of Ethylene- response –factor 1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, n. 1 v. 29, p. 23-32, 2002.

BLUME, B.; NURNBERGER, T.; NASS, N. & SCHEEL, D. Receptor mediated increase in cytoplasmatic free Calcium required for activation of pathogen defense in Parsley. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1425-1440, 2000.

BLUMWALD, E.; AHARON, G. S. & LAM, B. C-H. Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. **Reviews Elsevier Science**, n.9, v. 3, p. 342-346, 1998.

BRAGA, M. R. **Fitoalexinas em Rubiáceas nativas de mata e cerrado induzidas por *Trichoderma pseudokoningii***. 1988. 197p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade estadual de São Paulo, São Paulo, 1988.

BURGOS, R.C., CHIANG, V.L., ZHANG, X.H. *et al.* RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction to extraction in guanidine. **Biotechniques**, v. 19, p. 734-737, 1995.

CARELS N, VIDAL R, MANSILLA R, FRIAS D. The mutual information theory for the certification of rice coding sequences. **FEBS Lett.** V. 18, p. 155-8, 2004

CHENG, J.; PARK, T. S.; CHIO, L. C *et al.* Induction of apoptosis by sphingoid long chain bases in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biology**, n. 1, v. 23, 2003.

CHICHKOVA, N. V.; KIM, S. H.; TITOVA, E. S *et al.* A plant caspase-like protease activated during the Hypersensitive Response. **The Plant Cell**, v. 16, p. 157-171, 2004.

CHI-MANZANERO-MANZANERO, B., ROBERT, M.L. AND RIVERA-MADRID, R. Extraction of total RNA from a high pigment content plant Marigold (*Tagetes erecta*). **Mol Biotechnol.**, v. 16, p.17-21, 2000.

CHRISPEELS, M. J.; HOLUIGUE, L.; LATORRE, R *et al.* Signal transduction networks and the biology of plant cells. **Biol. Res.**, v. 32, p. 35-60, 1999.

CONRATH, U.; PIETERSE, M. J. & MAUCHI – MANI, B. Priming in plant- pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, , n. 5, v. 7, p. 210-216, 2002.

COSTET, L.; DOREY, S.; FRITIG, B. & KAUFFMAN, S. A pharmacological approach to test the diffusible signal activity of Reactive Oxygen intermediates in elicitor treated Tobacco leaves. **Plant Cell Physiol.**, n. 1, v. 43, p. 91-98, 2002.

COUPE, S. A ; WATSON, L. M.; RYAN, D. J. *et al.* **Journal of Experimental Botany**, n. 394, v. 55, p. 59-68, 2004.

CREELMAN, R. A.; TIERNEY, M. L. & MULLET, J. Jasmonic Acid/ Methyl Jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4938-4941, 1992.

DANGL, J.L.; DIETRICH, R. A. & THOMAS, Senescence and Programmed Cell Death. In: B. Buchanan, W. Gruissen, R. Jones (eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. American society of Plant Physiologists, 2000 , p. 1044-1100.

DANON, A.; DELORME, V. & GALLOIS, P. Plant programmed cell death: A common way to die. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 647-655, 2000.

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

DEUNFF, E. L.; DAVOINE, C.; DANTEC, C. L.; BILLARD, J. P. & HUAULT, C. Oxidative burst and expression of germin/ oxo genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. **The Plant Journal**, v. 38, p. 412-431, 2004.

DIAS, L. A.S. **Melhoramento Genético do cacauero**. Editora Folha de Viçosa Ltda. 578 p., 2001.

DÍAZ, J.; HAVE, A. J. & KAN, J. A. L. The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1341-1351, 2002.

DICKMAN, M. B; PARK, Y. K.; CLEMENTE, W. L. & FRENCH, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** n. 12, v. 98, p. 6957-6962, 2001.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. I.: Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DREW, M. C.; HE, C. J. & MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, n. 3, v. 5, 2000.

EBEL, J.& MITHOFER, A. Early events in the elicitation of plant defence. **Planta**, v. 206, p. 335 - 348, 1998.

EWING B & GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8, n.3, p.186-94, 1998.

FELLBRICH, G.; ROMANSKI, A.; VARET, A. *et al.* NPP1, a *Phytophthora*- associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 32, p. 375 – 390, 2002.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H. e SCHMIDT, R.A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. **Plant Disease**, v.79, p. 787, 1995.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H. e SCHMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, n.6, v.7, p. 552-556, 1991.

FRANCESCHI, V. & HORNER, H. T. Calcium Oxalate crystals in plants, **The Botanical Review**, v. 46, p. 361-427, 1980.

GARCÊS, H.; DURZAN, D. & PEDROSO, M. C. Mechanical stress elicits Nitric Oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, v.87, p. 567-574, 2001.

GAVRIELLI, Y; SHERMAN, Y.& BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, p. 493- 501, 1992.

GECHEV, T. S.; GADJEV, I. Z. & HILLIE, J. Q. An extensive microarray analysis of AAL toxin induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 1185-1197, 2004.

GELLI, A.; HIGGINS, V. J. & BLUMWALD, E. Activation of plant plasma membrane C^{+2} -permeable channels by race-specific fungal elicitors. **Plant Physiology**, v. 113, p. 269-279, 1997.

GESTEIRA, A., MICHELI, F., FERREIRA, C.F. AND CASCARDO, J.C.M. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its

interaction with the pathogen *Crinipellis pernicios*a. **Biotechniques**, v. 35, p. 494-500, 2003.

GIL-AD, N. L. & MAYER, A. M. Evidence for rapid breakdown of Hydrogen Peroxide by *Botrytis cinerea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, p. 455-461, 1999.

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

GRANT, M. & MANSFIELD, J. Early events in host-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 312-319, 1999.

GREENBERG, J. T. Programmed cell death : A way of live for plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 12094-12097, 1996.

GREENBERG, J.T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 525-545, 1997.

GREENBERG, J. T. & YAO, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Cell microbiology**, n. 3, v. 6, p. 201-211, 2004.

GRIFFITH, G. W., BRAVO-VELASQUEZ, E., WILSON, F. J., LEWIS, D. M. & HEDGER, J. N. Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicios*a) of cocoa. In: J. P. Blakeman and B. Williamson (eds.) **The Ecology of Plant Pathogens**, CAB International, Wallingford, U.K., p. 245-265. 1994.

HAHN, M. G. Microbial elicitors and their receptors in plants, **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 34, p. 387-412, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K. E. AND JONES, J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HAMMOND-KOSACK, K. & JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: B. Buchanan, W. Gruissen, R. Jones (eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. American society of Plant Physiologists, 2000, p. 1102-1155.

HOEBERICHTS, F. A.; HAVE, A. T. & WOLTERING, E. J. A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*- infected leaves. **Planta**, v. 217, p. 517-522, 2003.

HOEBERICHTS F. A. & WOLTERING E. J. . Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. **Bioessays**. V. 25, n. 1:47-57, 2003.

HOFFMAN, T.; SCHIMIDT, J. S. ; XIANGYANG, Z. & BENT, A. Isolation of Ethylene-Insensitive Soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene for gene disease resistance. **Plant Physiology**, v. 119, p. 935 – 949, 1999.

HONG, Y; WANG, T. W.; HUDAK, K. A *et al.* An ethylene- induced cDNA encoding a lipase expressed at the onset of senescence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 15, v. 97, p. 8717-8722, 2000.

HSIEH, N., SHIH, C. H., CHEN, H. Y. *et al.* Effects of Tamm-hosfall protein on the protection of MCDK cells from oxalate induced free radical injury. **Urol. Res.**, v. 31, p. 10-16, 2003.

HU, X., BIDNEY, D. L., YALPANI, N. *et al.* Overexpression of a gene encoding Hydrogen peroxide-generating Oxalate Oxidase evokes defense responses in Sunflower. **Plant Physiology**, v. 133, p. 170-181, 2003.

JACKSON, A .O. & TAYLOR, C. B. Plant – Microbe Interactions: Life and Death at the interface. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1651-1668, 1996.

JACOBSON, M. D. Reactive oxygen species and programmed cell death. **TIBS Elsevier Science**. Talking Point, p. 83-86, 1996

JENNINGS J. M.; APEL-BIRKHOLOD, P.C.; MOCK, N. M. *et al.* Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep 1 from *Fusarium oxysporum*. **Plant Science**, v. 161, p. 891- 899, 2001.

JONES, A. M. Programmed cell death in development and defense. **Plant Physiology**, v. 125, p. 94-97, 2001.

JONES, P.G., ALLAWAY, D., GILMOUR, D.M. *et al.* Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Planta**, v. 216, p. 255-264, 2002.

JONG, A. J. D.; HOEBERICHTS, F. A.; YAKIMOVA, E. T.; MAXIMOVA, E.; WOLTERING, E. J. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase- like proteases. **Planta**, v. 211, p. 656-662, 2000.

JONG, A. J.; YAKIMOVA, E. T.; KAPCHINA, V. M. & WOLTERING, E. J. A critical role for ethylene in Hydrogen Peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. **Planta**, v. 214, p. 537-545, 2002.

KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. **Eukaryotic cell**, p. 191-199, 2003.

KAMOUN, S.; WEST, P. V.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A.; GROOT, K. E. & GOVERS, F. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1413-1425, 1998.

KEATES, S. E.; KOSTMAN, T. A. ; ANDERSON, J. D. & BAILEY, B. A. Altered gene expression in the three plant species in response to treatment with Nep 1, a fungal protein that causes necrosis. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1610-1622, 2003.

KIM, M.; AHN, J. W.; JIN, U. H.; CHOI, D.; PAEKS, K. H. & PAI, H. S Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 21, v. 278, p. 19406- 19415, 2003.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1711-1722, 1996.

KOCHHAR, S., GARTENMANN, K., GUILLOTEAU, M. AND MCCARTHY, J. Isolation and characterization of 2S cacao seed albumin storage polypeptide and the corresponding cDNA. **J Agric Food Chem.**, 49, p. 4470-7, 2001.

KUNKEL, B. N. & BROOKS, D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current opinion in Plant Biology**, v. 5, 325 – 331, 2002.

LACOMME, C. & SANTA CRUZ, S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 7956-7961, 1999.

LALOI, M., MCCARTHY, J., MORANDI, O., GYSLER, C. AND BUCHELI, P. Molecular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. **Planta**, v. 215, p. 754-62, 2002.

LAM, E. Controlled cell death, plant survival and development. **Nature**, v.5, p. 305-315, 2004.

LAM, E.; PONTIER, D.; POZO, O .P. Die and let live – programmed cell death in plants. **Current Opinion Plant Biology**, v. 2, p. 502-507, 1999.

LANE, B. G., DUNWELL, J. M., RAY, J. A., SCHMITT, M. R. & CUMING, A. C. Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 12239-12242, 1993.

LANE, B. G. Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germins. **Biochem. J.**, v. 349, p. 309-321, 2000.

LEACH, J. E.; VERA CRUZ, C. M.; BAI, J.; LEUNG, H. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 39, p. 187-224, 2001.

LECOURIEUX, D., MAZARS, C., PAULY, N., RANJEVA, R. & PUGIN, A. Analysis and effects of cytosolic free Calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. **The Plant Cell**, v. 14, p. 2627-2641, 2002.

LI, J., WANG, D. Y., LI, Q., XU, Y. J., CUI, K. M. & ZHU, Y. X. PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic *Arabidopsis* plants possibly by delaying cytosolic Ca⁺² elevation. **Cell calcium**, v. 35, p. 71-77, 2004.

LILJEROTH, E. & BRYNGELSSON, T. Earlier onset of DNA fragmentation in leaves of wheat compared to barley and rye. **Hereditas**, v. 136, p. 108-115, 2002.

LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; ALMEIDA, A .; SILVA, M. T.; BARRIENTOS, A . & CÔRTE-REAL, M. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the cell**, v. 13, p. 2598-2606, 2002.

LU, H. & HIGGINS, V. J. The effect of Hydrogen Peroxide on the viability of tomato cells and of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 54, p. 131-143, 1999.

LUND, S. T. ; STALL, R. E. & KLEE, H. J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **The Plant Cell**, v. 10, p. 371 – 382, 1998.

MACEDO, J. N. Caracterização funcional do indutor de necrose de *Crinipellis pernicioso* em *Theobroma cacao*, 2004. 62 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia, 2004.

MATSUMURA, H.; NIRASAWA, S.; KIBA, A.; URASAKI, N.; SAITOH, H.; ITO, M.; YAMADA, M. K.; UCHIMIYA & TERAUCHI, R. Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. **The Plant Journal**, v. 33, p. 425-434, 2002.

MAXWELL, D. P.; NICKELS, R. & McINTOSH, L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. **The Plant Journal**, n. 3, v. 29, p. 269-279, 2002.

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

McCABE, P. F.; LEVINE, A. ; MEIJER, P. J.; TAPON, N. A. & PENNELL, R. A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density. **The plant Journal**, n. 12, v. 2, p. 267- 280, 1997.

MILLER, C., KENNINGTON, L., COONEY, R., KOHJIMOTO, Y., CAO, L. C., HONEYMAN, T., PULLMAN, J., JONASEN, J. & SCHEID, C. Oxalate toxicity in renal epithelial cells: characteristics of apoptosis and necrosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 162, p. 132-141, 2000.

MITTLER, R. Cell death in plants. IN: LOCKSHIN, R. A., ZAKERI, Z. & TILLY, J.L. (Eds), **When cells die**, Wiley-Lis, New York, 1998, p. 147-174.

MITTLER, R. & LAM, E. Identification, characterization and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. **Plant cell**, v. 7, p. 1951-1962, 1995.

MITSUHARA, I.; MALIK, K. A.; MIURA, M. & OHASHI, Y. Animal cell-death suppressors Bcl-xl and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. **Current Biology**, v. 9, p. 775-778, 1999.

MIYAZAWA, K., SUZUKI, K., IKEDA, R., MORIYAMA, M. T., UEDA, Y. & KATSUDA, S. Apoptosis and its related genes in renal epithelial cells of the stone forming rat. **Urology Research**, 2004, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 2004.

MONTESANO, M.; BRADER, G. & PALVA, T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, n. 4, v. 1, p. 73-79, 2003.

NING, S. B.; SONG, Y. C. & DAMME, P. V. Characterization of the early stages of programmed cell death in maize root cells by using comet assay and the combination of cell electrophoresis with annexin binding. **Electrophoresis**, v. 23, p. 2096-2102, 2002.

NING, S. B.; WANG, L.; LI, Z. Y.; JIN, W. W.; SONG, Y. C. Apoptotic cell death and cellular surface negative charge increase in maize roots exposed to cytotoxic stresses. **Annals of Botany**, v. 87, p. 575-583, 2001.

OKU, H. Gene expression in susceptibility and resistance of fungal plant diseases. In: Desh Pal S. Verma (ed.) **Molecular signals in plant – microbe communications**. CRC- Boca Raton, 1992, 511 p., 49-63.

ORZÁEZ, D. & GRANELL, A. The Plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down regulated during senescence of flower petals. **FEBS Letters**, v. 404, p. 275-278, 1997.

PANAVAS, T., LEVANGIE, R., MISTLER, J., REID, P. D. & RUBINSTEIN, B. Activities of nucleases in senescing daylily petals. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, p. 837-843, 2000.

PASQUALINI, S.; PICCIONI, C.; RELAE, L.; EDERLI, L.; TORRE, G. D. & FERRANTI, F. Ozone- induced cell death in Tobacco cultivar Bel W3 Plants. The role of

programmed cell death in lesion formation. **Plant physiology**, v. 133, p. 1122-1134, 2003.

PEDROSO, M. C. & DURZAN, D. J. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. **Annals of Botany**, v. 86, p. 983-994, 2000.

PEDROSO, M. C., MAGALHÃES, J. R. & DURZAN, D. A Nitric Oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. **Journal of Experimental Botany**, n. 51, v. 51, p. 1027-1036, 2000 a.

PEDROSO, M. C., MAGALHÃES, J. R. & DURZAN, D. Nitric Oxide induces cell death in *Taxus* cells, **Plant Science**, v. 157, p. 173-180, 2000 b.

PENNELL, R. I. & LAMB, C. Programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1157-1168, 1997.

PEREIRA, J.L.; RAM, A; FIGUEIREDO, J.M. and ALMEIDA, L.C.C. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica** n., v.1, p. 79-81, 1989.

POUND F. J. Cacao and witches' broom disease. Trinidad Reprinted 1982 in Arch. Cocoa Research. v.1, p. 73-92, 1938.

PRICE A. H. , TAYLOR A, RIPLEY SJ, GRIFFITHS A, TREWAVAS A.J. , KNIGHT M. R. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. **Plant Cell** 6: 1301–1310, 1994.

PURDY, L. H.; SCHIMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology and management. **Annu. Rev. Phytopathology**, v. 34, p. 537 – 94, 1996.

QUTOB, D.; HRABER, P. T.; SOBRAL, B. W. S & GIJZEN, M. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. **Plant Physiology**, v. 123, p. 243-254, 2000.

QUTOB, D.; KAMOUN, S. & GIJZEN, M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **The Plant Journal**, v. 32, p. 361-373, 2002.

RYALS, J.; LAWTON, K. A.; DELANEY, T. P. FRIEDRICH, L. ; KESSMAN, H.; NEUEENSCHWANDER, U.; UKNES, S.; VERNOOIJ, B. & WEYMANN, K. Signal transduction in Systemic acquired resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 4202-4205, 1995.

RYERSON, D. & HEATH, M. C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. **The Plant Cell**, v. 8, p. 393-402, 1996.

SARICA, K., YAGCI, F., BAKIR, K., ERBAGCI, A, ERTURHAN, S. & UÇAK, R. Renal tubular injury induced by hyperoxaluria: evaluation of apoptotic changes. **Urol. Res.**, v. 29, p. 34-37, 2001.

SCARPARI, L.M.; MEINHARDT, L.W; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A.W.V.; SCHIAVINATO, M.A.; CASCARDO, J.C.M. & PEREIRA, G.A.G. 'BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF COCOA (*Theobroma cacao* L.) INFECTED BY *Crinipellis pernicios*, CAUSAL AGENT OF WITCHES' BROOM DISEASE. Submetido para o **Journal of Experimental Botany**, 2004.

SCHEEL, D. Resistance response physiology and signal transduction. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 305-310, 1998.

SCHEIDELER, M, SCHLAICH, N. L., FELLEBERG, K., BEISSBARTH, T, HAUSER, N. C., VINGRON, M., SLUSARENKO, A J.& HOHEISEL, J. D. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.12, p. 10555-10661, 2002.

SCHNEIDERBAUER, A., SANDERMANN, H.JR, AND ERNST, D. Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 91-95, 1991.

SCHULTZ, D.J., CRAIG, R., COX-FOSTER, D.L., MUMMA, R.O. AND MEDFORD, J.I. RNA isolation from recalcitrant plant tissue. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 12, p.310-316, 1994.

SCHWARTZ, L. M., SMITH, S. W., JONES, M. E. E. & OSBORNE, B. A . Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 90, p. 980-984, 1993.

SILVA, S. D. V. M. **Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauero a *Crinipellis perniciosa***. 1997. 93 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

SILVA, S. D. V.; LUZ, E. D. M. N.; ALMEIDA, O .C; GRAMACHO, K. P. & BEZERRA, J. L. Redescrção da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauero. **Agrotropica**. CEPLAC, Itabuna, BA, n.1, v. 14, p. 1-23, 2002. Edição especial.

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

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M *et al.* The involvement of cysteine proteases and proteinase inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 11, p. 431-443, 1999.

STONE, J. M.; HEARD, J. E. ; ASAI, T. & AUSUBEL, F. M. Simulation of fungal mediated cell death by Fumonisin B1 and selection of Fumonisin B1 resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1811- 1822, 2000.

SUZUKI, Y., MAKINO, A. AND MAE, T. An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. **J. Exp. Bot.**,v. 52, p. 1575-1579, 2001.

SWIDZINSKY, J. A.; SWEETLOVE, L.J. & LEAVER, C. J. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, , n. 4, v. 30, p. 431-446, 2002.

TORRES, L. E. S. & VARGAS, F. D. Apoptosis : the phenomenon and its determination. **Téc Pecu Méx.** , n. 1, v. 41, p. 49-62, 2003.

TURNER, J. G.; ELLIS, C. & DEVOTO, A. The Jasmonate Signal Pathway. **The Plant Cell**, p.153-164, 2002.

TYLER, B. M. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 40, p. 137-67, 2002

VASCONCELOS, A T. R., ALMEIDA, D. F., HUNGRIA, M, A. *et al.* The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 100, n. 20, p. 11660-11665, 2003.

VEIT, S.; WORLE, J. M.; NURNBERGER, T.; KOCH, W. & SEITZ, H. U. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in Carrot, *Arabidopsis* and Tobacco. **Plant physiology**, v. 127, p. 832- 841, 2001.

WANG, H.; LI, J.; BOSTOCK, R. M.; GILCHRIST, D. G. Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a Host selective phytotoxin and invoked during development. **The Plant Cell**, v. 8, p. 375-391, 1996.

WANG, S.X., HUNTER, W. AND PLANT, H. Isolation and purification of functional total RNA from woody branches and needles of Sitka and White Spuce. **Biotechniques**, v. 28, p. 292-296, 2000.

WEES, S. C. M. V.; SWART, E. A. M.; PELT, J. A. V *et al.* Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 15, v. 97, p. 8711-8716, 2000.

WHEELER, B. E. J. The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue. In: Moore D, Casselton LA, Wood DA, Frankland JC, eds. **Developmental Biology of Higher Fungi**. Cambridge University Press, 103-16, 1985.

WOLPERT, T. J.; DUNKLE, L. D. & CIUFETTI, L. M. Host selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 40, p. 251-285, 2002.

WOLTERING, E. J.; BENT, A. V. D. & HOEBERICHTS. Do plant caspases exist? **Plant Physiology**, v. 130, p. 1764-1769, 2002.

XIAO, S.; BROWN, S.; PATRICK, E *et al.* Enhanced transcription of the *Arabidopsis* disease resistance genes RPW8.1 and RPW8.2 via a Salicylic Acid dependent

amplification circuit is required for Hypersensitive cell death. **The Plant Cell**, v. 15, p. 33-45, 2003.

YU, L. M. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 4088-4094, 1995.