

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



ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM
FOLHAS DE *Hevea brasiliensis* INDUZIDO POR
***Microcyclus ulei*.**

DANIELA MARTINS KOOP

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Março de 2010

DANIELA MARTINS KOOP

**ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM FOLHAS DE *Hevea
brasiliensis* INDUZIDO POR *Microcyclus ulei*.**

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

Área de concentração: Biotecnologia e Genômica.

ILHÉUS – BAHIA - BRASIL

Março de 2010

K76 Koop, Daniela Martins.
Análise do processo de morte celular em folhas de Hevea brasiliensis induzido por Microcyclus ulei / Daniela Martins Koop. – Ilhéus : UESC, 2010.
xiv, 85. : il.
Orientador : Dominique Garcia.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui bibliografia.

1.Seringueira – Doenças e pragas. 2. Mal-das-folhas da seringueira. 3. Seringueira – Melhoramento genético. 4. Microcyclus ulei. I. Garcia, Dominique. II. Título.

CDD – 633.8952

DANIELA MARTINS KOOP

ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM FOLHAS DE *Hevea
brasiliensis* INDUZIDO POR *Microcyclus ulei*.

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

Área de concentração: Biotecnologia e Genômica.

APROVADA: 01 de março de 2010

Dra. Maria de Jesus Barbosa Cavalcante
(EMBRAPA – CPAFAC)

Dra. Karina Peres Gramacho
(CEPLAC)

Prof^o Dr. Júlio Cezar de Mattos Cascardo
(UESC)

Dr. Dominique Garcia
(UESC / CIRAD – Orientador)

Aos meus pais, Jacy Olavo Koop
e Jocelia Martins Koop, e aos meus
irmãos, Leonardo e Denise, pelo
amor, carinho e incentivo,

Ao Thyago, pela compreensão,
ajuda, dedicação e força,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela oportunidade e a CAPES, pela concessão da bolsa.

A Plantação Michelin da Bahia (PMB) pelo financiamento do projeto.

Ao meu orientador, Dr. Dominique Garcia, pela confiança e aprendizado.

A minha co-orientadora, prof Dra. Delmira da Costa Silva, pelo apoio.

Aos técnicos e amigos do Centro de Microscopia Eletrônica (UESC), pela presença e ajuda, em especial a Valéria.

Aos técnicos do laboratório de fitopatologia das Plantações Michelin da Bahia (Ituberá), pelo apoio na realização das inoculações e coletas, imprescindíveis ao desenvolvimento deste projeto.

A Luciana e Fabrícia, secretárias do PPGGBM, pela amizade, dedicação e presteza.

A minha família: meus pais, Jacy Olavo e Jocelia, pelo exemplo de vida, pela força e credibilidade, por serem a “mola propulsora” para as minhas conquistas, e por não medirem esforços para que eu pudesse ir em busca dos meus sonhos; e aos meus irmãos, Denise e Leonardo, pelo incentivo e carinho.

Aos meus familiares: avós, tios e primos, por sempre torcerem para que tudo desse certo.

Aos meus amigos que estão longe geograficamente, mas que nunca deixaram de estar ao meu lado: Adi, Fernando, Jose, Fran, Nice, Diego, Angélica, Fernanda, Ju, Rafa, Léo, Héder e Edu.

A família que eu escolhi, por ser o porto seguro longe de casa: Drika, Adryell, Juli, Josi, Angela, Beth, Igor, James, Fabi, Karin e Américo, em especial a Gabi, grande responsável por eu estar aqui hoje.

Ao Thyago, pela força, motivação, companheirismo, por ser ao mesmo tempo “colega de trabalho”, amigo e namorado, e principalmente por fazer suportar a saudade de casa e dar o ânimo para começar mais um dia.

Aos colegas do PPGGBM e “agregados” (Samuel e Leandro), pelas trocas, desabafos, conquistas e momentos de descontração.

A todas as pessoas que de alguma forma participaram desta formação, torcendo, incentivando, apoiando e, principalmente, acreditando.

OS MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

ÍNDICE

EXTRATO	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A seringueira	4
2.2 O cultivo de seringueira no Brasil.....	7
2.3 O mal-das-folhas.....	8
2.3.1 O ciclo da doença	10
2.3.2 O <i>Microcyclus ulei</i>	12
2.3.4 As raças fisiológicas	14
2.3.5 A epidemiologia	15
2.3.6 O melhoramento genético ao mal-das-folhas	16
2.4 As interações planta-patógeno.....	17
2.5 A morte celular programada (PCD).....	19
2.5.1 A morte celular programada no desenvolvimento da planta.....	22
2.5.2 A morte celular programada nas interações planta-patógeno.....	26
2.5.3 A sinalização durante HR.....	29
2.5.4 A regulação da morte celular programada em plantas	30

3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material vegetal.....	33
3.2 Inoculação e obtenção das amostras	33
3.2.1 Inoculação	33
3.2.2 Coleta das amostras.....	34
3.3 Análises histológicas	34
3.3.1 Preparação do material vegetal para inclusão em resina	34
3.3.2 Corte e montagem das lâminas.....	35
3.3.3 Coloração do material	35
3.4 Análises de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick end labeling)	36
3.4.1 Preparação do material vegetal para inclusão em parafina.....	36
3.4.2 Corte e montagem das lâminas.....	37
3.4.3 Desparafinação e rehidratação	37
3.4.4 Permeabilização e detecção da fragmentação do DNA	37
3.5 Análise da fragmentação do DNA.....	38
3.5.1 Extração de DNA e eletroforese em gel de agarose	38
3.6 Análise da expressão gênica via macroarranjos	39
3.6.1 Os macroarranjos	39
3.6.2 Extração de RNA total.....	40
3.6.3 Tratamento com DNase.....	40
3.6.4 Marcação dos cDNAs alvos e hibridação do arranjos.....	41
3.6.5 Análise estatística das hibridações dos macroarranjos	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Avaliação sintomatológica.....	43
4.2 Reações tissulares precoces de folhas de <i>Hevea brasiliensis</i> infectadas por <i>Microcyclus ulei</i>	45
4.3 Análise da fragmentação do DNA em gel de agarose	52

4.4 Detecção e quantificação de células com núcleos TUNEL-positivos	55
4.5 Análises do perfil de expressão gênica de genes relacionados a estresse e defesa	62
5 DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	73
7 REFERÊNCIAS.....	74

EXTRATO

KOOP, Daniela Martins, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2010. **ANÁLISE DO PROCESSO DE MORTE CELULAR EM FOLHAS DE *Hevea brasiliensis* INDUZIDO POR *Microcyclus ulei*.**
Orientador: Dr. Dominique Garcia. Co-orientadora: Dra. Delmira da Costa Silva.

O “Mal-das-folhas” (SALB, South American Leaf Blight), causado pelo fungo ascomyceto, *Microcyclus ulei*, é responsável pela baixa produtividade da seringueira (*Hevea brasiliensis*) nas regiões tropicais úmidas da América Latina e representa uma grande ameaça para a produção mundial de borracha natural. O melhoramento genético da seringueira é a opção mais sustentável para controlar a doença. Em vários patossistemas, as reações de apoptose ou morte celular programada estão associadas à resistência aos fungos biotróficos ou suscetibilidade aos fungos hemibiotróficos. Por essa razão, este trabalho objetivou detectar e descrever à escala histológica e ao nível gênico a morte celular de três genótipos de seringueira com resistências diferentes: PB314 altamente suscetível a todos os isolados de *M. ulei*, MDF180 com resistência parcial a todos os isolados, e FX2784 com resistência total (com reação de hipersensibilidade, HR), parcial ou suscetibilidade dependendo do isolado. Para esta finalidade, folhas de seringueira de PB314, MDF180 e FX2784 foram inoculadas com uma suspensão de conídios de *Microcyclus ulei*, coletadas em 12, 24, 48, 96, 168 e 240 horas após inoculação (hai). Folhas não inoculadas também foram coletadas. As análises histológicas, além de confirmar pela primeira vez a localização intercelular do micélio, permitiram comparar o nível de degradação dos tecidos infectados nos três genótipos e relacioná-lo com a resistência dos mesmos. Para detectar a fragmentação do DNA, eletroforese em gel de agarose e o kit “*In Situ Cell Death Detection*” (Roche Applied Science) foram utilizados. A primeira técnica, demonstrou-se pouco sensível

para detectar o padrão típico de fragmentação do DNA. A segunda, permitiu a detecção de alguns núcleos com reação TUNEL-positivos 168 hai no clone suscetível PB314, nos tecidos infectados pelo fungo, fortalecendo a hipótese que *M. ulei* poderia ser um fungo hemibiotrófico. Para verificar o perfil de expressão de genes de estresse e defesa, os dados de macroarranjos de cDNA foram analisados. Dentro desse grupo funcional, são encontrados genes com alto nível de expressão no clone MDF180, dos quais as funções prováveis estão associadas a R-gene (NBS-LRR, Cf5), à via de síntese das ligninas (*cinnamoyl CoA reductase, enolase, alcohol dehydrogenase, peroxidase*), à atividade inibidora de proteases (cistatina), à proteína relacionada a patogênese e *thioredoxine dependent peroxidase*. Esta última enzima regula o nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células e nos tecidos e protege contra os danos oxidativos. Aumentos da expressão mais tardios são observados no clone PB314 para os genes LRR *disease resistant*, proteínas PR, quitinase, MnSOD, peroxidase, enolase, inibidor de protease. Genes como *Bax inibidor* e *defender against cell death like molecule* não apresentam variações significativas entre os genótipos MDF180 e PB314. Em conclusão, PCD pode ocorrer no clone suscetível, PB314 na fase tardia da infecção. Essas mortes celulares podem estar associadas à uma latência na expressão de genes R e dos genes relacionados com detoxificação de EROs e via de síntese de ligninas. No clone com resistência parcial, MDF180, os tecidos apareceram menos degradados apesar da presença do micélio e as reações de PCD não foram detectadas 168 hai. A redução das EROs por aumento de expressão de enzimas de detoxificação ou produção de *scavengers* pode ser responsável pela integridade dos tecidos.

Palavras-chave: seringueira, resistência, Mal-das-Folhas, apoptose, expressão gênica.

ABSTRACT

KOOP, Daniela Martins, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2010. **ANALYSIS OF CELL DEATH IN *Hevea brasiliensis* LEAVES TRIGGERED BY *Microcyclus ulei***. Advisor: Dr. Dominique Garcia. Advisor Committee: Dra. Delmira da Costa Silva.

South American Leaf Blight caused by the ascomycete, *Microcyclus ulei*, is responsible for the low productivity of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in tropical Latin America areas and it represents a great menace for the world production of natural rubber. Breeding program of rubber tree is the most viable option to control this fungus. In several pathosystems, the apoptotic reactions or programmed cell death are associated to the resistance to biotrophic fungi or susceptibility to hemibiotrophic fungi. For this reason, this work aimed to detect and describe at the nuclear and genetic level the cellular death of three genotypes of rubber with different resistances: PB314 highly susceptible to all isolates of *M. ulei*, MDF180 with partial resistance to all isolates, and FX2784 with total resistance (with hypersensitivity reaction, HR), partial or susceptibility depending of the isolate. For this purpose, inoculated leaves of PB314, MDF180 and FX2784 with *M. ulei* spores were collected in 12, 24, 48, 96, 168 and 240 hours after inoculation (hai). Non-inoculated leaves were collected. The histological analyses, beside the confirmation for the first time of the intercellular location of the mycelium, allowed to compare the level of degradation of the infected tissues in three genotypes and to relate it with the resistance of the same ones. To detect DNA fragmentation, agarose gel electrophoresis and the "In Situ Cell Death Detection" kit (Roche Applied Science) were used. The first, was demonstrated not very sensitive to detect the typical pattern of fragmentation of the DNA. The second, allowed the detection of some nuclei

with Tunnel-positive reaction, 168hpi in the susceptible clone, PB314, in infected tissue by the fungi, strengthening the hypothesis that *M. ulei* could be a hemibiotrophic fungi. To verify the expression profile of stress and defence genes, the data of cDNA macroarray were analyzed. Inside this functional group, genes with high expression level in the genotype MDF180 were detected with probable functions associated to R-gene (NBS-LRR, Cf5), lignin pathway (cinnamoyl CoA reductase, enolase, alcohol dehydrogenase, peroxidase), protease inhibitor (cystatin), Pathogenesis Related Protein activities, and Thioredoxine dependent peroxidase activities. This last enzyme regulates the level of species reactive oxygen species (ROS) in the cells and the tissue and protects against the oxidative damages. Latest increase of expression are detected in the PB314 genotype for the LRR-disease resistant, protein PR, chitinase, MnSOD, peroxidase, enolase, protease inhibitor. Bax inhibitor and “defender against cell death like molecule” genes did not present significant variations between the MDF180 and PB314 genotypes. In conclusion, PCD can occur in the susceptible genotype, PB314 in the late phase of the infection. These cellular deaths are associated to a delay in the expression of R-genes, genes involved in detoxification of ROS and lignin synthesis. In the partial resistance genotype, MDF180, tissue were less degraded in spite of the mycelium presence, and PCR reactions were not detected 168 hpi. The reduction of the ROS associated to an increase of expression of detoxication enzymes or scavengers production could be responsible of a better conservation of the tissues.

Key-words: rubber tree, resistance, South American Leaf Blight, apoptose, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Seringueira.....	5
Fig. 2. Estágios de ontogenia foliar proposto por Hallé et al., 1978.....	6
Fig. 3. Sintomas do mal-das-folhas da seringueira em clone suscetível (PB314).....	9
Fig. 4. Ciclo de mal-das-folhas (<i>M. ulei</i>) da seringueira.....	11
Fig. 5. Fases assexuada e sexuada do fungo <i>M. ulei</i>	13
Fig. 6. Interações planta-patógeno.....	19
Fig. 7. Diferenças morfológicas entre necrose e apoptose.....	20
Fig. 8. Quadros de resistência ou suscetibilidade em interações com fungos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos em resposta à superexpressão do gene BAX inibidor-1.....	32
Fig. 9: Extratos de RNA (tratados por DNase) em gel de agarose 1% de folhas de seringueira de lesões e de folhas saudas dos genótipos MDF180 e PB314.....	41
Fig. 10. Evolução dos sintoma em folhas infectadas.....	44
Fig. 11. Secções transversais (3 µm) de folhas de seringueira 24 hai, coradas com azul de toluidina.....	46
Fig. 12. Secções transversais (3 µm) de lesões em folhas de seringueira, 240 hai, coradas com azul de toluidina.....	47
Fig. 13. Secções transversais de folhas de seringueira de PB314, coradas com PAS + <i>naphthol blue black</i>	48

Fig. 14. Secções transversais de folhas de seringueira de MDF180, coradas com PAS + <i>naphthol blue black</i>	50
Fig. 15. Secções transversais de folhas de seringueira de FX2784, coradas com PAS + <i>naphthol blue black</i>	51
Fig. 16. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% de amostras infectadas e sadias de PB314 e MDF180, tratadas com RNase.....	53
Fig. 17. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% de amostras infectadas de PB314 e MDF180.....	53
Fig. 18. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% de amostras infectadas e não infectadas de PB314 e MDF180.....	54
Fig. 19. Secções transversais de folhas de seringueira, fixadas com adesivo de Bissing e <i>poli-L-lysine</i>	56
Fig. 20. Secções transversais de folhas de seringueira do PB314, sondadas com TUNEL.....	58
Fig. 21. Secções transversais de folhas de seringueira do MDF180, sondadas com TUNEL.....	59
Fig. 22. Secções transversais de folhas de seringueira do FX2784, sondadas com TUNEL.....	61
Fig. 23. Agrupamento hierárquico mostrando o perfil de expressão gênica temporal nos genótipos MDF180 e PB314 com 311 genes apresentando um nível de expressão relativo significativamente diferente pelo menos em um estágio de desenvolvimento da lesão.....	64
Fig. 24. Nível de expressão relativo (MDF180 vs. PB314) de genes envolvidos no estresse oxidativo em lesões novas, intermediárias e velhas coletadas em folhas de <i>Hevea brasiliensis</i> dos genótipos MDF180 e PB314.....	66
Fig. 25. Explosão oxidativa em PB314.....	71
Fig. 26. Produção de H ₂ O ₂ após ataque do patógeno.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características da apoptose em animais.....	21
Tabela 2. PCD em plantas durante o desenvolvimento.....	23
Tabela 3. Escala de notas para avaliação dos sintomas do mal-das-folhas.....	43
Tabela 4. Eficiência dos adesivos histológicos baseado na relação cortes aderidos x cortes perdidos.....	57
Tabela 5. Relação de núcleos TUNEL-positivos em PB314, MDF180 e FX2784.....	62
Tabela 6. Genes de defesa e estresse significativamente expressos pelo menos em um estágio de desenvolvimento das lesões foliares nos genótipos MDF180 ($M \geq 2$) e/ou PB314 ($M \leq -2$).....	65

1 INTRODUÇÃO

O fitopatógeno, hospedeiro-específico da seringueira, *Microcyclus ulei* Henn. v. Arx, agente do mal-das-folhas, doença endêmica na América Latina tropical, representa uma ameaça para a produção mundial de borracha, sendo considerado pelo Grupo Australiano como arma biológica (<http://www.australiagroup.net>). Na infecção das folhas jovens de seringueira por *M. ulei* observa-se um curto período com ausência de sintomas da doença (período de latência). As lesões têm sempre um tamanho limitado entre 0,5 até 5 mm e podem ser confluentes. Não se observa reações necróticas sistêmicas. A germinação dos conídios e a penetração das folhas ocorrem nas primeiras 24 horas após a inoculação (hai). As hifas se propagam rapidamente de forma intercelular através dos parênquimas e 3 dias após inoculação (dai), se diferenciam na face abaxial da folha em conidióforos (LIEBEREI, 2007). A esporulação abundante do fungo ocorre entre 8 e 14 dai. Folhas altamente infectadas caem e são rapidamente degradadas, enquanto folhas com um nível médio de infecção permanecem na árvore e permitem o desenvolvimento na face superior das estruturas estromáticas com ascosporos (GASPAROTTO et al., 2007).

Algumas reações das plantas contra o ataque de patógenos envolvem uma resposta de morte celular, que podem ser de duas formas: a necrose, que se caracteriza pela turgescência celular com subsequente lise da membrana plasmática; e a apoptose ou morte celular programada (*Programmed Cell Death* – PCD), caracterizada pelo encolhimento do citoplasma, clivagem do DNA nuclear em oligonucleossomos e pela formação de corpos apoptóticos (DANGL et al., 2000). Os indutores de morte celular podem ser fisiológicos, biológicos, químicos ou físicos (TORRES; VARGAS, 2003).

Várias formas de PCD aparecem em plantas. A resposta mais comum de morte celular está associada com a resposta de resistência a patógenos, a Reação de Hipersensibilidade, conhecida como HR (*hypersensitive response*) (BEERS; MCDOWELL, 2001; GREENBERG; YAO, 2004; HEATH, 2000). Essa forma rápida e extremamente localizada de morte celular é, na maioria das vezes, uma forma eficaz, através da qual as plantas se previnem contra o desenvolvimento ou colonização, particularmente para patógenos foliares biotróficos (LIU et al., 2005). Em contraste, outros estudos sugerem que a morte celular associada à HR pode ser um evento relacionado com a suscetibilidade já que pode facilitar a infecção da planta por fungos patogênicos necrotróficos (GOVRIN; LEVINE, 2000; LINCOLN et al., 2002; VAN BAARLEN et al., 2004; YAO et al., 2002).

Em genótipos resistentes de seringueira ao *M. ulei*, Hashim et al. (1978) indicam que, as células em contato direto com a hifa de penetração colapsam logo depois da penetração. Esse autor descreve essa reação como uma HR. A HR pode ser observada em genótipos resistentes como FX2784 (SAMBUGARO et al., 2003) e FX2761 (GARCIA et al., 1995c). Estudos histológicos da resistência parcial (colonização dos tecidos foliares com esporulação fraca do fungo) revelaram necroses foliares aos 10 dai, no clone suscetível PB314, enquanto que no clone com resistência parcial, MDF180, os tecidos permaneceram íntegros apesar de uma colonização pelo patógeno (SAMBUGARO et al., 2003). Estudos da resistência, como é o caso do MDF180 que impede o desenvolvimento da fase sexuada do *M. ulei* (LE GUEN et al., 2008), são de grande importância para compreender os mecanismos de bloqueio do fungo, limitar a diversificação genética do fungo (GASPAROTTO et al., 2007; MATTOS et al., 2003) e identificar genes candidatos para apoiar programas de melhoramento visando a seleção de genótipos com resistência durável.

Para muitos sistemas patogênicos em plantas, uma importante forma para se conhecer o mecanismo de defesa é o estudo da interação gênica (BENT, 1996; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1996). Por esta razão, este trabalho objetiva verificar a ocorrência de apoptose nos tecidos foliares de três

genótipos de *Hevea* infectados por *M. ulei*, através de observações histológicas e técnicas de detecção de fragmentação internucleossomal, relacionando estes eventos com a expressão de genes de estresse e defesa ao longo da formação da lesão foliar nos genótipos MDF180 e PB314.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A seringueira

O gênero *Hevea* pertence à família Euphorbiaceae e compreende 11 espécies, tendo como área de ocorrência a Amazônia brasileira, Bolívia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana (GASPAROTTO et al., 1997). A espécie mais importante do gênero é a *H. brasiliensis* (Figura 1A) por ser a principal fonte comercial de borracha natural (HASHIM, 1978; HOLIDAY, 1970; SAMBUGARO, 2003). A obtenção do látex é feita de modo extrativo (Figura 1B). Além disso, a seringueira representa uma cultura alternativa, permitindo a utilização de áreas degradadas (GASPAROTTO et al., 1997).

A *H. brasiliensis* é uma espécie lenhosa e arbórea (Figura 1A), monóica, com flores unissexuais e folhas pecioladas e compostas trifolioladas (Figura 1C). O fruto é uma cápsula grande que geralmente apresenta três sementes (Figura 1C). Quando adulta, apresenta um período de senescência e queda das folhas, que geralmente ocorre na estação seca. A planta permanece desfolhada de duas a seis semanas e este período é denominado hibernação. O período de refohamento dos seringais é uma fase muito importante para a fitopatologia. As medidas de controle devem ser planejadas para esta época, pois a grande maioria dos ataques das doenças ocorre em folíolos jovens, como é o caso do mal-das-folhas (GASPAROTTO et al., 1997; SAMBUGARO, 2003).

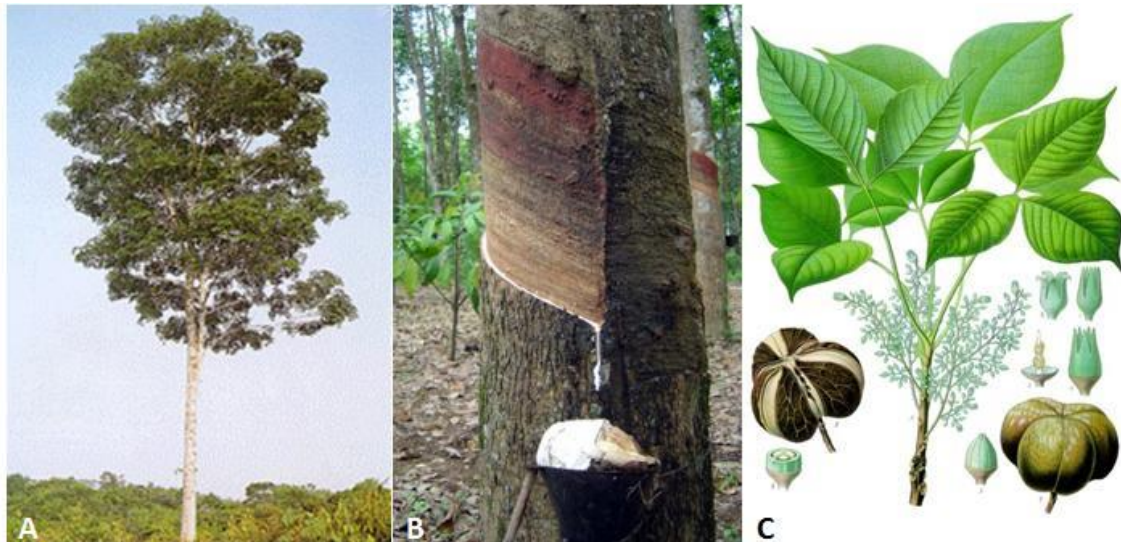


Figura 1. Seringueira. A – Árvore de *Hevea brasiliensis*. B – Modo extrativo (sangria) de obtenção do látex. C – Detalhe das folhas pecioladas e compostas trifolioladas e do fruto de seringueira.

De acordo com Hallé et al. (1978), os ciclos de ontogenia foliar divide-se em quatro fases (Figura 2), dependendo do nível de atividade do meristema apical e das fases de desenvolvimento foliar:

Estádio A: gema apical em atividade de divisão celular e morfogênese (formação de primórdios foliares e de gemas axilares). O intumescimento da gema torna-se visível devido ao afastamento das escamas protetoras. Esse estágio dura aproximadamente nove dias;

Estádio B: é a fase de alongamento. A atividade mitótica no meristema apical reduz a partir do início desta fase, sendo praticamente nula quando o crescimento torna-se mais rápido, ficando restrita ao folíolo, à gema em desenvolvimento e ao meristema subapical. Esse estágio dura em média dez dias e está dividido em outros dois subestádios:

B₁: folíolos na posição vertical, voltados para cima, de coloração antociânica intensa;

B₂: folíolos voltados para baixo com coloração menos intensa. É a fase de maior velocidade de alongamento do eixo caulinar.

Estádio C: folíolos pendentes, flácidos e de cor verde. Duração média de oito dias;

Estádio D: fase de dormência da gema apical e folhas totalmente amadurecidas. Esta fase dura geralmente treze dias (GASPAROTTO et al., 1997).

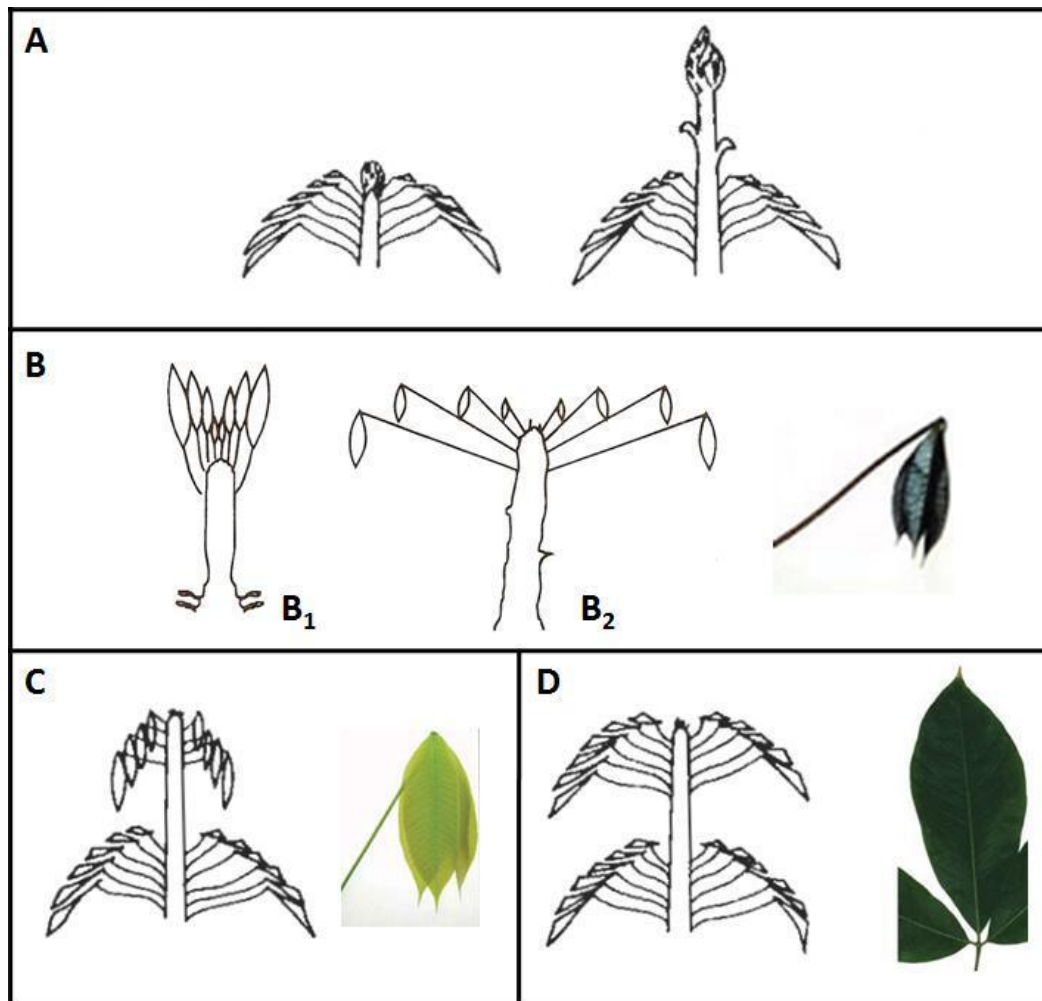


Figura 2. Estágios A, B, C e D da ontogenia foliar proposto por Hallé et al., 1978 (Adaptado de LIEBEREI, 2007; GASPAROTTO et al., 1997, PITA; OLIVA, 1987).

2.2 O cultivo de seringueira no Brasil

O ciclo de exploração da borracha natural no Brasil viveu o seu apogeu entre 1880 e 1910. Durante esta época, Brasil e Peru eram os únicos produtores de borracha no mundo. Em 1912, o Brasil já perdia a sua hegemonia mundial devido aos preços da borracha imposto pelos asiáticos. Em 1951, já passamos a importadores. Esse extrativismo entrou em decadência devido a dois fatores principais: 1) a entrada, no mercado internacional, de borracha proveniente dos países asiáticos; e 2) o surgimento da doença fúngica conhecida como mal-das-folhas. Atualmente, quem detêm a produção e exportação da borracha natural é a Malásia, a Indonésia e a Tailândia (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996).

Em 1928, em Fordlândia, Pará, a Cia. Ford implantou aproximadamente 3.500 ha de seringais. Seis anos depois, o mal-das-folhas destruiu cerca de 25% das plantações. Em 1934 e 1942, também foi implantado em Belterra, Pará, 6.500 ha de seringueira com clones trazidos da Ásia. Uma nova epidemia ocorreu em 1943 e só não destruiu completamente os seringais devido à enxertia de copa com material resistente proveniente de Fordlândia. Apesar de todos esses investimentos, em 1946, a Cia. Ford transferiu o empreendimento para o governo brasileiro.

Entre 1947 e 1983, a Firestone participou ativamente dos programas de melhoramento da resistência ao mal-das-folhas e trocas de germoplasma com outras instituições da América Latina. Porém, devido a baixa produtividade de látex do material genético comparado com os clones asiáticos ou a resistência ao fungo *Microcyclus ulei* quebrada, poucos clones foram distribuídos e recomendados para plantação em larga escala na América Latina (GARCIA et al., 2004).

Em 1950, outras tentativas de estabelecimento de seringais de cultivo, principalmente no sudeste da Bahia. Porém, em 1965, começaram severos surtos da doença que destruíram grande parte dessas plantações (GASPAROTTO et al., 1997).

Na década de 70, teve início um programa de incentivo à produção de borracha natural na Região Amazônica, que permitiu a implantação de 75.000 ha de seringais até 1982. Porém, uma série de problemas, como falta de pessoal treinado, de clones resistentes e de tecnologia para controlar a doença, culminaram, mais uma vez, no abandono da maioria desses seringais (GASPAROTTO et al., 1997).

De acordo com dados publicados pelo IAC, em 2004, a borracha produzida no Brasil vinha principalmente dos estados de São Paulo (51.450 toneladas – 49%), Mato Grosso (22.500 t – 22%), Bahia (9.500 t – 10%), Espírito Santo (6.000 t – 7%) (MARTINEZ, 2006), e a produção extrativista oriunda da Floresta Amazônica estava reduzida a (1,5%) (ROSSMANN, 2006).

2.3 O mal-das-folhas

O mal-das-folhas (ou South American Leaf Blight – SALB), causado pelo *M. ulei*, é a doença mais séria e uma das mais destrutivas da seringueira, além de representar um problema para o estabelecimento dos seringais de cultivo nas Américas do Sul e Central (GASPAROTTO et al., 1997).

O *M. ulei* é um patógeno altamente ameaçador pela rápida disseminação, difícil controle e alta capacidade de causar danos severos. O maior dano é a queda prematura das folhas. Por isso, ataques sucessivos do fungo podem causar a morte das plantas tanto pelo secamento dos ramos quanto pela facilidade de incidência de outras doenças às plantas afetadas (GASPAROTTO et al., 1997).

Desde o surgimento da doença, o mal-das-folhas tem sido responsável pelo abandono de grandes seringais: na Guiana, em 1913 e 1923; no Suriname, em 1918, quando um terço dos seringais foram destruídos; Panamá e Costa Rica, em 1940 (GASPAROTTO et al., 1997).

No Brasil, a doença ocorre em todos os estados onde a seringueira é cultivada. Nos países asiáticos, maiores produtores e exportadores de borracha, não ocorre a doença. Porém, o patógeno representa uma constante ameaça, já que os clones cultivados são suscetíveis (GASPAROTTO et al., 1997).

Os sintomas dependem da idade dos folíolos e da suscetibilidade do clone. Em folíolos jovens de clones suscetíveis, observam-se lesões irregulares que provocam deformações e enrugamentos nos lombos (Figura 3). Essas lesões, especialmente na face abaxial, apresentam tonalidades de cinza-esverdeadas a marrom-esverdeadas devido à esporulação conidial da fase assexuada ou anamórfica do *M. ulei*. Se estas lesões são produzidas em folíolos com cerca de 10 a 12 dias de idade, normalmente eles caem logo. Se os folíolos forem infectados após 12 dias de idade até o início da sua maturação não caem prematuramente. Nessas condições, as lesões são menores, geralmente circulares e apresentam pouca ou nenhuma esporulação conidial (GASPAROTTO et al., 1997).

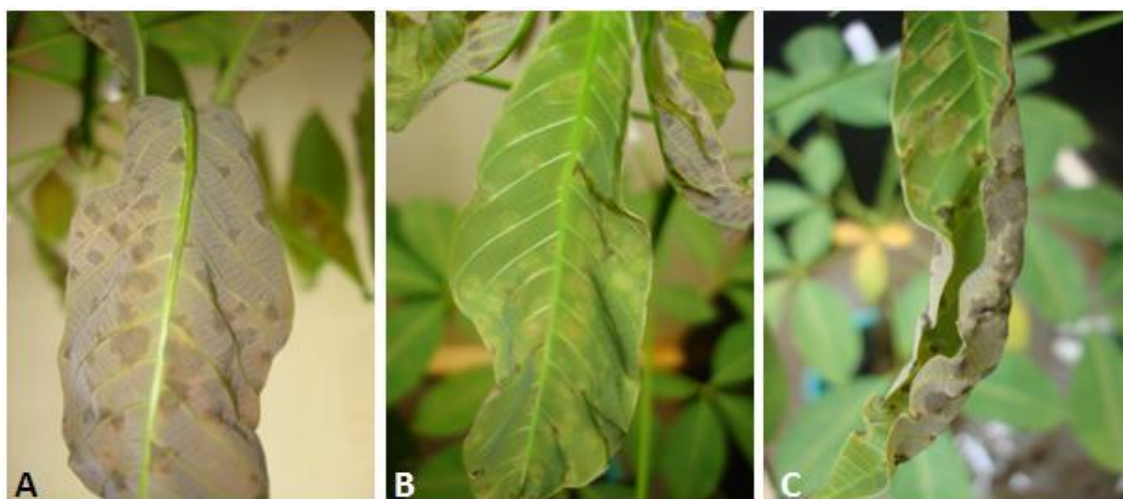


Figura 3. Sintomas do mal-das-folhas da seringueira em clone suscetível (PB314). A – C: Lesões irregulares e enrugamento da folha. A - Lesões na face abaxial, 168 hai. B - Lesões na face adaxial, 168 hai. C – Lesões, 240 hai, provocando forte enrugamento do limbo foliar.

O patógeno não consegue infectar folíolos maduros. Os folíolos infectados que permanecem na planta exibem, principalmente na face adaxial, o sintoma de lixa resultante da produção de estromas. É comum a observação de conjuntos estromáticos que circundam áreas lesionadas, cujas porções centrais se desprenderam do limbo. Análises microscópicas desses sintomas já foram realizadas, acompanhando o desenvolvimento da doença dos estágios iniciais aos finais (GASPAROTTO et al., 1997; SAMBUGARO et al., 2004).

2.3.1 O ciclo da doença

Os folíolos maduros prestes a cair apresentam os sintomas de lixa. Nos folíolos que caem ou naqueles que ficam retidos na planta os estromas são molhados por água da chuva ou orvalho. Isso provoca aumento da tensão interna dos ascostromas e resulta na ejeção dos ascosporos que são disseminados pelo vento ou pela chuva infectando folíolos novos, principalmente de outras plantas. Portanto, a fonte de inóculo são as folhas velhas e o inóculo primário são os ascóporos (GASPAROTTO et al., 1997).

Nos folíolos novos, os ascosporos absorvem água, germinam, produzem tubo germinativo e apressório, a partir dos quais as hifas se desenvolvem, penetram intercelularmente no tecido através dos parênquimas e colonizam os folíolos, independentemente da presença de aberturas naturais ou ferimentos, e de forma similar nos clones suscetíveis e resistentes (GASPAROTTO et al., 1997; GARCIA et al., 1999; LIEBEREI, 2007). Aproximadamente cinco a seis dias depois, os folíolos exibem lesões com esporulação conidial, mais abundante na face abaxial, correspondendo à fase assexuada do patógeno. Dos folíolos infectados que permanecem na planta, os conídios são disseminados pelo vento e chuva infectando novos folíolos jovens da mesma planta ou de plantas diferentes, do mesmo modo que os ascosporos. A fase explosiva da doença surge quando ocorrem novas condições policíclicas, causando novos desfolhamentos. Esta é a fase mais grave da enfermidade,

que causa debilitação fisiológica das árvores sujeitas a prolongado período de déficit energético (GASPAROTTO et al., 1997).

Nos folíolos maduros, os estromas revelam cavidades contendo ascos e ascosporos e outras vazias, as quais provavelmente já liberaram os esporos. Esses folíolos caem no período de senescência e queda das folhas, ainda abrigando ascosporos, inóculo primário, para dar continuidade ao ciclo de vida do patógeno (Figura 4) (GASPAROTTO et al., 1997).

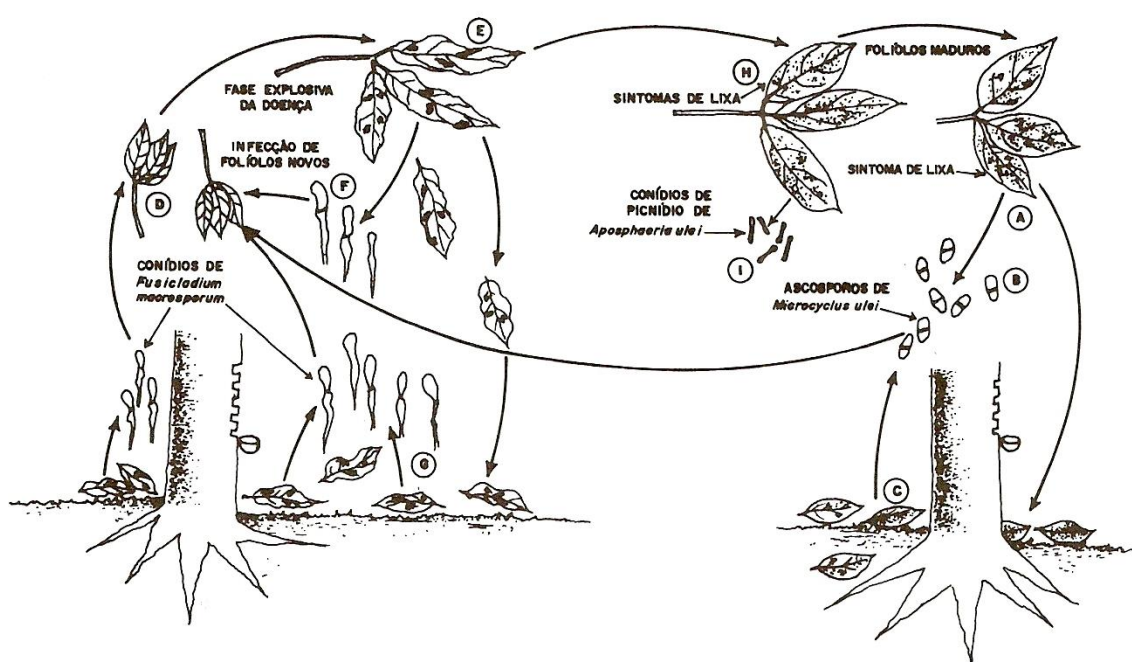


Figura 4. Ciclo do mal-das-folhas da seringueira (Fonte: Gasparotto et al., 1997).

Em resumo, os conídios são os principais disseminadores do patógeno e por isso, responsáveis pela severidade da doença. Os ascosporos são produzidos em quantidades menores e liberados progressivamente, permanecendo viáveis no interior das folhas retidas por muitos dias (BERGAMIN FILHO & AMORIN, 1996; SAMBUGARO, 2003).

Os sintomas surgem nos folíolos afetados cerca de 4 a 10 dai. O tempo necessário para a total formação de estromas é de dois meses. Gasta-se um mês para a formação dos ascos e mais um para o amadurecimento e liberação

dos ascosporos. Então a duração do ciclo de vida do patógeno é cerca de quatro a cinco meses (GASPAROTTO et al., 1997).

No Brasil, a doença ocorre em todos os estados onde a seringueira é cultivada: Bahia, Mato Grosso, Espírito Santo e São Paulo (SAMBUGARO, 2003).

2.3.2 O *Microcyclus ulei*

O fitopatógeno *M. ulei* (Figura 5), parasita obrigatório da seringueira e agente etiológico dos mal-das-folhas, foi coletado pela primeira vez por um pesquisador chamado E. Ule em árvores silvestres de *Hevea* sp. nos anos de 1900 e 1901, às margens do rio Juruá, no Amazonas, e nas proximidades de Iquitos, Peru, em 1902 (GASPAROTTO et al., 1997; HOLLIDAY, 1970).

Microcyclus ulei Henn. v. Arx pertence ao filo Ascomycota e à família Dothideaceae. Durante o ciclo biológico na seringueira, produz dois tipos de esporos infectivos durante a fase epidêmica da doença: 1) conídios - fase assexuada; e 2) ascosporos – fase sexuada (GASPAROTTO et al., 1997).

A fase assexuada ou anamórfica caracteriza-se pela formação de conidióforos simples, eretos ou geniculados, com uma a quatro cicatrizes conidiais (Figura 5A). Os conidióforos são formados a partir do tecido estromático subepidermal. Os conídios têm origem poliblastica, são hialinos a marrom-claros, de formato *sui generis*, variando de retos a sinuosos, com paredes lisas ou verrucosas, bases truncadas, geralmente uni ou bicelular (GASPAROTTO et al., 1997).

A fase sexuada ou teliomórfica é produzida em ascostromas ou pseudotécios ou cavidades estromáticas dentro dos estromas que geralmente são encontrados agregados lateralmente, formando círculos ou montículos, especialmente na superfície adaxial dos folíolos (Figura 5B). Esses estromas são negros, carbonáceos e têm paredes externas rugosas. Os ascos são bitunicados, clavados, hialinos, irregularmente elipsoidais e fusóides,

bicelulares, com septos que dividem os ascosporos em duas células desiguais, a maior com porção mais afilada, é orientada para a base do asco (GASPAROTTO et al., 1997).

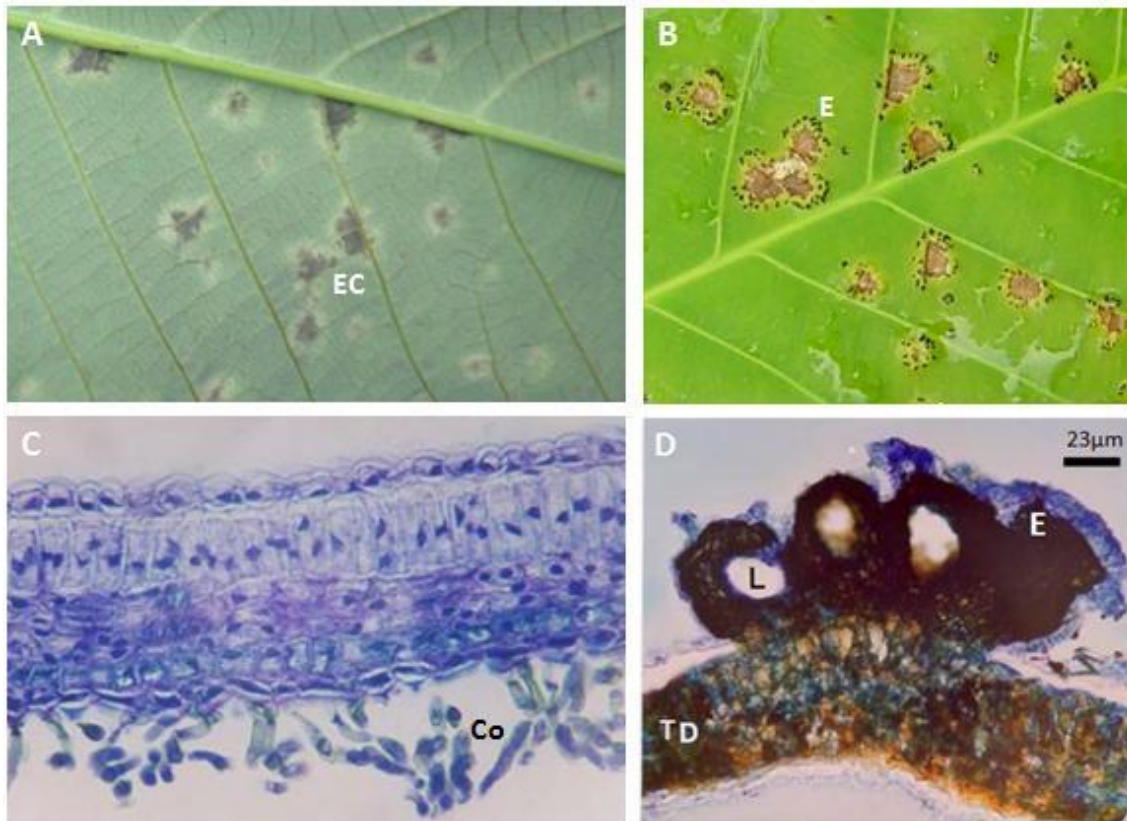


Figura 5. Fases assexuada e sexuada do fungo *M. ulmi*. A e C – Fase assexuada, ou conidiana. A- Esporulação na superfície da folha observados em microscópio fotônico. C – Conídios em secção transversal de folha de MDF180, 5 dai. B e D – Fase sexuada ou estromática. B – Estromas (E) na superfície adaxial da folha. D – Estroma em secção transversal, 135 dai. Co: conídios; E: estroma; TD: tecidos degenerados; L: lóculo vazio, após a liberação dos esporos. (Figuras C e D – adaptadas de SAMBUGARO et al., 2004).

2.3.4 As raças fisiológicas

Desde 1946, é admitida a existência de variabilidade fisiológica do patógeno. Em 1961, Langford relatou a ocorrência de raças de *M. ulei* que atacavam clones resistentes (F409 e F1619), em Santarém, Pará, e na progênie do clone F4542, na Costa Rica (GASPAROTTO et al., 1997).

Na Flórida, em 1965, Langdon, citado por Gasparotto et al. (1997), identificou duas raças de *M. ulei* através de inoculações com isolados da Guatemala e Costa Rica. A raça 1, de um isolado da Guatemala, não atacava F4542. Já a raça 2, o isolado da Costa Rica, infectava e esporulava abundantemente em F4542. Em 1966, Miller, citado por Gasparotto et al. (1997) identificou outras duas raças denominando-as de raça 3 e 4. A raça 3, da Guatemala e Costa Rica, não atacava progênies de Madre de Dios, Peru, mas atacava progênies do F4542. A raça 4, de Belém (Pará), atacava o clone F409 e parentes do IAN713, mas não atacava progênies do clone F4542.

Junqueira et al. (1986), citado por Gasparotto et al. (1997), realizaram em Viçosa (MG) um estudo sobre a reação de 33 clones de seringueira a 16 isolados do patógeno, provenientes de diversos estados do Brasil. Foi possível observar que alguns isolados infectavam e esporulavam em determinadas progênies ou clones e não infectavam outros. Um isolado não esporulou em nenhum dos clones testados sendo considerado avirulento. Portanto, os isolados apresentaram grande variabilidade fisiológica. A virulência dos isolados variou de acordo com o clone infectado.

Gasparotto e Junqueira (1994) admitem que existem raças ecofisiológicas de *M. ulei* adaptadas a regiões onde o clima é considerado adverso para este patógeno.

A presença da fase sexuada o ano todo aumenta a possibilidade de combinação gênica e mutações ocasionais, provalvemente causa da alta variabilidade patogênica deste fungo (GASPAROTTO et al., 1997).

2.3.5 A epidemiologia

Plantas jovens de seringueira com três a quatro anos de idade emitem folhas durante o ano todo. Plantas adultas normalmente trocam as folhas uma vez por ano no período seco. Às vezes, ocorre uma segunda troca anual devido às condições climáticas. Quando *M. ulei* infecta os folíolos novos com até 12 dias de idade, plantas jovens e/ou adultas ficam expostas a surtos severos da doença durante um longo período (GASPAROTTO et al., 1997).

Alguns estudos já foram realizados relacionando intensidade de esporulação, diâmetro e número de lesões com condições climáticas como a precipitação (quantidade e duração) e a temperatura. Holliday, citado por Gasparotto et al. (1997), verificou que a esporulação conidial era intensa e a doença severa quando a precipitação ficava acima de 6mm/dia, mas era diminuída ou paralisada quando a precipitação diária ficava em torno de 3 a 4mm, durante pelo menos 20 dias. Chee, em 1976, observou maior número de lesões com maior diâmetro e elevada esporulação à 24°C, havendo significativa redução dos sintomas abaixo de 20°C e acima de 28°C. A melhor combinação temperatura-tempo de molhamento foliar para a ocorrência de infecção foi de 24°C e 16h de molhamento foliar. Em campo, a severidade da doença estava positivamente relacionada com a umidade relativa do ar maior ou igual a 95% (GASPAROTTO et al, 1997).

Os conídios são disseminados, principalmente pelo vento, quando a temperatura é mais elevada e a umidade relativa é baixa, no período de 9 às 14 horas. Porém, para que os conídios germinem e infectem folíolos novos é necessário um período de 8 a 10 horas consecutivo de molhamento foliar. As condições mais favoráveis para a ocorrência do mal-das-folhas em Ituberá, Bahia, foram de umidade relativa superior a 95% por 10 horas consecutivas, durante 12 noites por mês (GASPAROTTO et al, 1997).

A germinação dos conídios em água é iniciada após uma hora e meia, e quatro a cinco horas depois todos os esporos viáveis já germinaram. Os tubos

germinativos produzem apressório (geralmente de 7 a 8 hai) antes da emissão das hifas, que penetram nos tecidos foliares (GASPAROTTO et al, 1997).

Os ascosporos, presentes nas cavidades estromáticas, são responsáveis pela sobrevivência do patógeno em condições adversas (ausência de tecidos do hospedeiro, umidade e temperaturas mais baixas), além de se manterem viáveis por vários dias, mesmo caídos no chão (GASPAROTTO et al., 1997).

2.3.6 O melhoramento genético ao mal-das-folhas

As espécies de maior interesse quanto à resistência ao *M. ulei* e ao melhoramento são *H. brasiliensis* (maior produtividade e variabilidade genética de resistência), *H. benthamiana* (resistência e variabilidade genética em produtividade), *H. pauciflora* (altamente resistente), *H. camporum*, *H. camargoana* (porte baixo importante para o controle químico de doenças foliares) (GASPAROTTO et al., 1997).

As espécies *H. brasiliensis* e *H. spruceana* apresentam grande diversidade genética, desde plantas extremamente suscetíveis ao patógeno até plantas praticamente imunes (GASPAROTTO et al., 1997).

As primeiras seleções de clones resistentes ao mal-das-folhas foram feitas na década de 30, pela Companhia Ford, em Fordlândia e Belterra (PA). Esses clones foram designados pela letra F (clones Ford). Dentre os 32 clones F de *H. pauciflora*, duas seleções P9 e P10 destacaram-se como mais resistentes ao *M. ulei*, sendo as espécies *H. pauciflora* e *H. benthamiana* as mais utilizadas nos programas de melhoramento, visando a incorporação de resistência a *H. brasiliensis*. Cruzamentos realizados entre os clones Ford e os clones produtivos de *H. brasiliensis* do Oriente receberam a denominação de FX. Os cruzamentos realizados a partir de 1945 pelo Instituto Agrônomo do Norte receberam a sigla IAN (GASPAROTTO et al., 1997).

Os trabalhos de melhoramento desenvolvidos em Belterra e Belém, Pará, cruzaram clones nativos e resistentes com clones orientais produtivos, mas suscetíveis. Desses cruzamentos obtiveram diversos clones com características desejáveis: FX25, FX3009, FX3028, FX3810, FX2261, FX3899, FX4098, IAN710, IAN713, IAN717 e IAN873 (GASPAROTTO et al., 1997). Porém, a maioria deles já teve a resistência contornada por *M. ulei*.

Dentre os trabalhos mais recentes sobre melhoramento da seringueira ao mal-das-folhas, Garcia et al. (2004) avaliaram a resistência e a produção de látex em 36 clones de seringueiras, plantados em Ituberá (Bahia-Brasil), oriundos do banco de germoplasma da Plantação Michelin da Bahia. Dos clones testados quanto ao tipo de reação foi possível a identificação de apenas poucos clones produtivos e resistentes ao fungo: MDX 624, MDX 607, FDR 4575, FDR 5597, FDR 5240, FDR 5665, FDR 5802, FDR 5788, CD 1130, CD 1174, CDC 312, CDC 308, CDC 56 e PMB 1.

O clone MDF180, quando infectado pelo *M. ulei*, desenvolve lesões com uma esporulação cotidiana em um nível moderado, característico de resistência parcial. Já o desenvolvimento da fase estromática, até o momento, nunca foi relatado neste clone, tanto em condições controladas de inoculação quanto em infecções naturais. Enquanto que a resistência de outros clones de seringueira duram apenas poucos anos, a resistência parcial do MDF180 se mantém a mais de 30 anos e, por essa razão, é considerada uma resistência durável. Entretanto, a produtividade do MDF180 é insuficiente para permitir uma plantação em escala industrial, mas as características da sua resistência o torna um bom parental para os programas de melhoramento da seringueira (LE GUEN et al., 2008).

2.4 As interações planta-patógeno

Muitos microrganismos são capazes de infectar plantas ocasionando sérias doenças que podem causar danos significativos à agricultura. Um

exemplo disso é o mal-das-folhas da seringueira (*Hevea brasiliensis*), causada pelo fungo *Microcyclus ulei*, que comprometeu drasticamente o mercado exportador da borracha no Brasil.

As plantas geralmente produzem uma resposta de defesa ao ataque de patógenos, pois apresentam mecanismos de defesa que podem ser constitutivos ou pré-formados (cutícula espessada, tecidos lignificados, compostos fenólicos e outros) ou induzidos pela infecção (proteínas relacionada à patogênese – PR, espécies reativas de oxigênio – ERO's; fitoalexinas, ligninas, caloses, entre outros) (ANDRADE, 2008; GARCIA, 1995a, RESENDE et al., 2003; GARCÍA-OLMEDO et al., 2001).

Então, a resistência ou suscetibilidade a determinado patógeno depende de fatores como o reconhecimento do patógeno e a ativação das vias de transdução de sinal e de moléculas de defesa. Por essa razão, as interações planta-patógeno (Figura 6) são classificadas em dois tipos: 1) interações compatíveis, quando o sistema de defesa é tardiamente ativado ou não ativado levando à doença ou suscetibilidade; e 2) interações incompatíveis, quando o sistema de defesa é prontamente ativado condicionando a resistência. Essa resistência pode ser específica e, neste caso, conhecida como uma resposta gene-a-gene devido à existência de um gene de resistência na planta (R) e um gene de avirulência no patógeno (Avr) (RESENDE et al., 2003, GARCÍA-OLMEDO et al., 2001).

Uma injúria ao tecido vegetal, como a tentativa de infecção por patógenos avirulentos ativa a bateria de defesa da planta. Quando ocorre o reconhecimento ligante-receptor específico (Avr-R), a resposta de defesa está frequentemente associada a uma resposta local e restrita ao sítio de infecção, denominada Resposta de Hipersensibilidade (do inglês, Hypersensitive Response – HR), que tem a finalidade de impedir a disseminação do patógeno (COEGO et al., 2005; HANCOCK et al., 2002; REZENDE et al., 2003; STASKAWICZ et al., 1995).

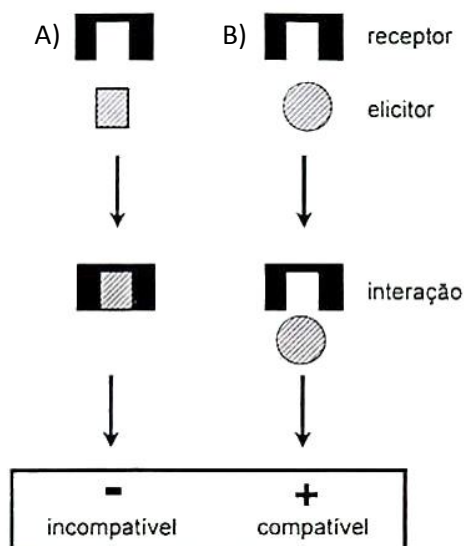


Figura 6. Interações planta-patógeno. A – Interação incompatível. Ausência de doença devido ao reconhecimento do(s) produto(s) Avr do patógeno pelo(s) gene(s) R do hospedeiro, conhecido como teoria gene-a-gene, proposta por Flor em 1942. B – Interação compatível. Suscetibilidade do hospedeiro por não reconhecer os elicitores do fungo e ativar uma resposta de defesa.

Fungos biotróficos permitem o reconhecimento e ativação das defesas do hospedeiro para que este consiga sobreviver ao ataque e forneça nutrientes para que o fungo possa completar o seu ciclo de vida (WISE et al., 2007). Os fungos necrotróficos ativam a morte dos tecidos do hospedeiro, geralmente através da liberação de toxinas, já que alimentam-se exclusivamente de tecidos mortos ou que estão morrendo. Já os fungos hemibiotróficos apresentam uma fase biotrófica, geralmente um período de latência, para que possa se nutrir por certo tempo até passar para a fase necrotrófica ocasionando colapsos dos tecidos do hospedeiro (KEON et al., 2007).

2.5 A morte celular programada (PCD)

A morte celular pode ser de dois tipos: necrose e apoptose. A necrose ou morte celular acidental ou patológica é caracterizada pela turgescência

celular e subsequente lise da membrana (Figura 7A). A apoptose ou morte celular programada (*programmed cell death* – PCD), assim como a apoptose em animais, inclui clivagem endonucleotídica do DNA (*ladder*) (DANGL et al., 2000; RYERSON; HEATH, 1996), a ativação de proteases similares a caspases (NAVARRE; WOLPERT, 1999) e a formação de estruturas semelhantes a corpos apoptóticos (Figura 7B) (DANGL et al., 2000; LI; DICKMAN, 2004; WANG et al., 1996). As principais características citológicas e bioquímicas da PCD estão descritas na Tabela 1.

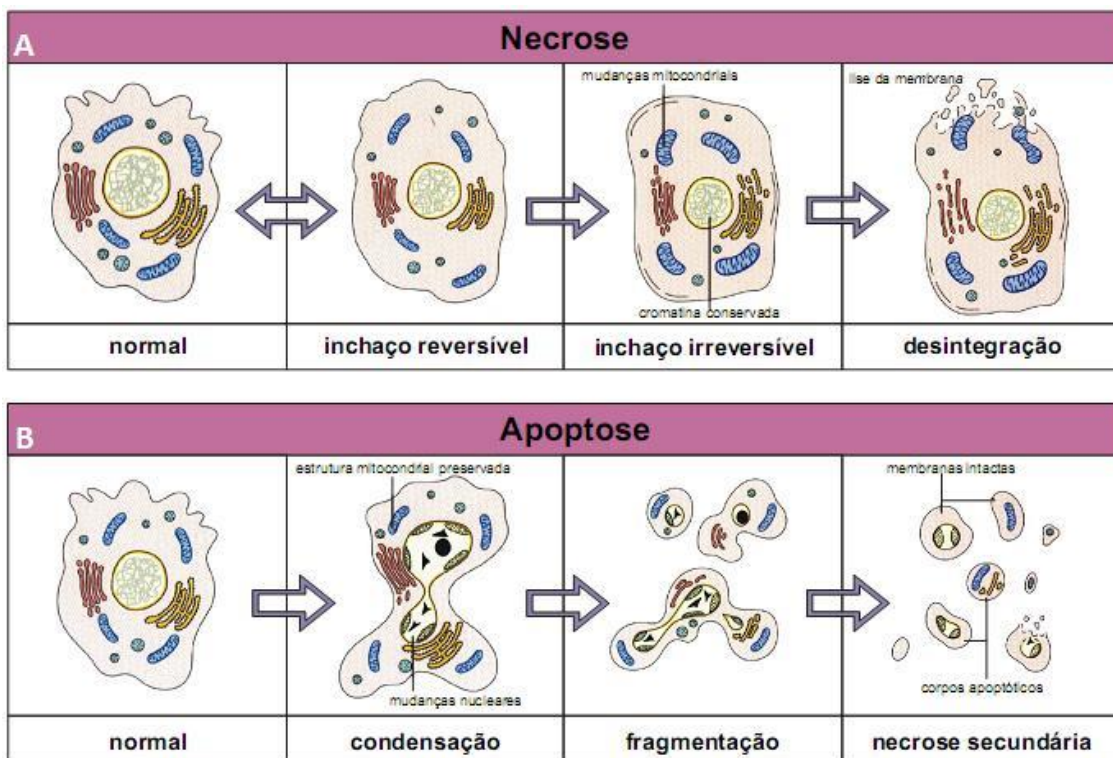


Figura 7. Diferenças morfológicas entre necrose e apoptose. A – Necrose: turgescência progressiva e irreversível provocando a lise da membrana. B – Apoptose: condensação celular; fragmentação nuclear e celular; e formação de corpos apoptóticos (Fonte: Bioagency).

Tabela 1. Principais características da apoptose em animais (NOODÉN, 2004).

Características Citológicas	Características Bioquímicas
Convolução, vacuolização e fragmentação do citoplasma	Ativação da cascata de caspases
Condensação da cromatina que se prende à carioteca	Clivagem endolítica de muitas proteínas (por exemplo, proteínas estruturais da membrana nuclear) e Poli ADPribose (RADP, uma enzima de reparo de DNA)
Condensação e fragmentação do núcleo	Clivagem do DNA em fragmentos entre os nucleossomos
Formação de vesículas ou corpos apoptóticos que podem incluir fragmentos do núcleo	Exposição da fosfatidilserina na superfície interna da membrana plasmática

A PCD é um processo essencial ao desenvolvimento celular e crescimento regular de organismos multicelulares (DANON et al., 2000.). Ela ocorre em diversos processos do desenvolvimento, tanto em animais quanto em plantas (GREENBERG;YAO, 2004; NOODÉN, 2004; WILLIAMS; DICKMAN, 2008). Mas, diferentemente das células animais, as células vegetais exibem diversas características únicas quando comparadas com células animais, incluindo a ausência de caspases verdadeiras, a presença de uma parede celular rígida e, mais importante, a falta de um sistema de fagocitose ativo. Outra característica única é que as células vegetais apresentam totipotência, cloroplastos, vacúolos originando altos níveis de enzimas degradativas (WILLIAMS; DICKMAN, 2008).

Algumas proteases e nucleases que são induzidas durante a germinação podem estar envolvidas na PCD de células da aleurona em cevada. O ácido giberélico (GA) promove a morte celular e regula a produção de proteases e nucleases enquanto que o ácido abscísico (ABA) evita a morte celular e inibe a síntese dessas enzimas (WANG et al., 1996).

A apoptose também é ativada em resposta a uma série de mudanças ambientais e na presença de patógenos (GREENBERG, 1997; PENNEL & LAMB, 1997, NOODÉN, 2004). Diversas formas de PCD são observadas nas plantas, mas a mais comum está associada com uma resposta de resistência a patógenos, conhecida como HR (hypersensitive response) (BERRS; McDOWEL, 2001; GREENBERG; HEATH, 2000; YAO, 2004).

O conceito de PCD vem das plantas, à cerca de estudos de reações vegetais à invasão de fungos e estudos sobre senescência, desde 1923. Porém, surpreendentemente, a apoptose em plantas foi negligenciada e muitos estudos foram desenvolvidos até então sobre PCD em animais a partir de 1965 (NOODÉN, 2004). Por essa razão, ainda não há informações suficientes para concluir que as células animais e vegetais regulam a PCD através de mecanismos básicos comuns. Atualmente, já está melhor documentado o importante papel desempenhado pela PCD ao longo do ciclo de vida das plantas (NOODÉN, 2004).

2.5.1 A morte celular programada no desenvolvimento da planta

Diversos sistemas-modelo tais como protoplastos de aleurona de cevada, *Zinnia elegans* e *Arabidopsis thaliana* (At) têm sido estudados em relação à apoptose durante o desenvolvimento da planta. Alguns desses processos (ex. formação dos elementos traqueais) demonstram traços característicos de autofagia, tais como turgescência, modificações na parede celular, desaparecimento gradual de organelas e citoplasma seguido pelo colapso do vacúolo e autólise (WILLIAMS; DICKMAN, 2008). Em contraste, processos tais como a formação da coifa e a senescência apresentam características marcantes de apoptose, incluindo a condensação e a contração da cromatina, fragmentação do núcleo, e a formação de corpos apoptóticos (GIULIANI et al., 2002). Alguns exemplos de ocorrência de PCD durante o desenvolvimento da planta são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. PCD em plantas durante o desenvolvimento (Adaptada de NOODÉN, 2004).

Descrição	Referências
Células da aleurona	WANG et al., 1996; FATH et al., 2000
Diferenciação dos elementos traqueiais	FUKUDA, 1996; MITTLER 1998; WILLIAMS & DICKMAN, 2008; GROOVER et al., 1997; OBARA et al., 2001; MITTLER & LAM, 1995
Formação do aerênquima	DREW et al., 2000; NOODÉN, 2004
Células da coifa	LAUX & JURGENS, 1997; HUH et al., 2002; WANG et al., 1996
Processos de abscisão	NOODÉN, 2004
Maturação de flores	CALDERON-UREA & DELLAPORTA, 1999; NOODÉN, 2004
Gametogênese (aborto do megásporo)	NOODÉN, 2004
Formação do tubo polínico	NOODÉN, 2004
Morte celular do endosperma	YOUNG & GALLIE, 2000

Os processos de morte celular têm início na germinação. Um exemplo disso são as células da aleurona, em sementes de cereais. Durante a germinação, as células da aleurona apresentam características de PDC: vacuolização aumentada; perda repentina da integridade da membrana e rápida condensação de remanescentes de protoplastos (FATH et al., 2000).

Os vasos de xilema consistem de uma série de células mortas interconectadas denominadas de elementos traqueiais (TEs), que transportam água e minerais das raízes para os brotos via perda evaporativa dos estômatos das folhas. Os TEs, quando maduros, não tem nenhum protoplasto. A

diferenciação consiste no espessamento da parede secundária seguido imediatamente de morte celular e autólise (FUKUDA, 1996; GREENBERG; YAO, 2004; WILLIAMS; DICKMAN, 2008). Inicialmente, enzimas líticas incluindo nucleases e proteases são sintetizadas seguidas por um espessamento da parede celular. Durante o espessamento da parede celular secundária, vacúolos autofágicos degradam o conteúdo citoplasmático. Seguindo a digestão autofágica do citosol, alterações no Ca^{2+} citosólico e a atividade da serino protease extracelular dispara o colapso do vacúolo central, resultando na degradação do DNA nuclear e material celular remanescente deixando apenas a parede celular rígida. O colapso celular precedido de uma repentina alteração na permeabilidade do tonoplasto parece ser o passo irreversível na PCD seguida da degradação de núcleos em 10 a 20 minutos e a degradação total de todo o conteúdo celular em 6 a 8 horas (FUKUDA, 1997; GROOVER et al., 1997; OBARA et al., 2001). Em zínia, as serino proteases aparecem nos estágios finais da diferenciação dos TE. Uma serino protease de 40 kD pode estar envolvida na ruptura do vacúolo e na PCD (GROOVER; JONES, 1999).

Raízes de espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas também sofrem morte celular e autólise em resposta a uma série de fatores ambientais, entre eles hipóxia, impedância mecânica, e privação de nutrientes orgânicos. A morte ocorre em raízes primárias geralmente entre as células corticais, um centímetro ou menos do meristema apical da raiz. A ocorrência de PCD durante a formação do aerênquima é caracterizada pela indução através do hormônio etileno, pelo padrão de morte celular localizada dentro do córtex da raiz, e pela detecção de núcleos TUNEL-positivos no início da indução de morte celular (DREW et al., 2000; NOODÉN, 2004).

A formação do aerênquima compartilha muitas características de PCD com os TEs. Além disso, o aerênquima necessita da dissolução das células mortas sugerindo que enzimas hidrolíticas podem estar envolvidas. O primeiro sinal de morte celular é o colapso de células do córtex a partir da perda da integridade do tonoplasto, como ocorre na diferenciação dos TEs. Entre os

poucos genes que estão ligados à PCD em plantas, diversos deles estão expressos em raízes (NOODÉN, 2004).

A coifa representa um órgão especializado que fornece ao menos duas funções diferentes. Primeiro, as células da coifa fornecem uma proteção mecânica ao meristema da raiz, a origem do tecido da raiz. Segundo, elas acumulam uma alta concentração de polissacarídeos, que com a explosão destas células fornece a lubrificação necessária para a ponta da raiz. Evidências sugerem que a explosão das células da coifa é programada e está associada com traços característicos da apoptose tais como núcleos TUNEL-positivos, e a formação de vesículas assemelhando-se com corpos apoptóticos contendo DNA degradado nas células da coifa (HUH et al., 2002; WANG et al., 1996).

Os processos de abscisão exercem um programa genético para que ocorra a separação. Evidências indicam que as células da zona de abscisão sintetizam e secretam hidrolases, incluindo proteases e nucleases, e que algumas dessas enzimas podem atuar na destruição das paredes celulares. Os processos de abscisão compartilham características comuns com PCD em resposta a patógenos, como a indução de etileno, de proteínas relacionadas à patogênese e envolvimento de EROs (NOODÉN, 2004).

A PCD também está presente na diferenciação de estruturas reprodutivas. Diversas plantas produzem flores perfeitas ou hermafroditas. O desenvolvimento ou de pistilo ou de antera é interrompido e a PCD segue resultando em um único sexo. Células que abortam a formação inicial bissexual tornam-se intensamente vacuoladas e o conteúdo de ribossomos e organelas diminui à medida que a degeneração progride (NOODÉN, 2004).

Durante a gametogênese são produzidas quatro células haplóides. Desse total, três células degeneram. O aborto do megásporo, possivelmente, é a consequência de apoptose seletiva. Na antera, a gametogênese ocorre com PCD de diversos tipos de células. A morte das células do tapete apresenta características típicas deste processo, como a condensação celular, polarização do citoplasma, vacuolização, adelgaçamento da parede celular e

ruptura celular. Tanto a presença de tapete quanto a sua degeneração via PCD parece essencial para o desenvolvimento normal do pólen (NOODÉN, 2004).

Morte celular ocorre durante a polinização, na formação do tubo polínico, após a germinação ou antes da abertura floral. Recentemente, foi proposto que a PCD está envolvida na morte celular de células do estilete no crescimento do tubo polínico (NOODÉN, 2004).

Após a fertilização, células sinérgidas, antipodais, células do endosperma e coleorriza morrem por meio de PCD. O suspensor, estrutura através da qual o embrião recebe nutrientes, degenera nos últimos estágios de desenvolvimento do embrião por PCD. Durante a maturação das sementes ocorre morte celular do endosperma. Em milho, a morte celular do endosperma ocorre entre 16 e 40 dias após a polinização (d.a.p.). Ocorre produção de etileno cerca de 16 a 20 d.a.p. e, novamente, entre 32 e 40 d.a.p. Dados sugerem que o etileno pode atuar como sinalizador na PCD em células do endosperma em milho, e estudos mais recentes indicam que ABA e espécies reativas de oxigênio podem também estar envolvidas (YOUNG; GALLIE, 2000).

2.5.2 A morte celular programada nas interações planta-patógeno

A morte celular do hospedeiro ocorre em muitas interações entre plantas e seus patógenos. A PCD pode ser benéfica (resistência) ou maléfica (suscetibilidade) para a planta. Durante as interações biotróficas, PCD, em particular a HR, evita a infecção já que os biotróficos necessitam de células vivas para o crescimento e colonização. Ao contrário, PCD em resposta aos patógenos necrotróficos, que se alimentam de tecidos mortos ou que estão morrendo, é vantajosa para o patógeno e não para a planta. (GREENBERG; YAO, 2004; WILLIAMS; DICKMAN, 2008).

A resposta de PCD mais estudada nas interações é a HR, caracterizada como uma resposta extremamente rápida e localizada de morte da célula infectada e das células adjacentes a ela, evitando a disseminação do patógeno

nos tecidos do hospedeiro. Além disso, a morte celular está envolvida na ativação de mecanismos de defesa para interromper o ataque do patógeno (NOODÉN, 2004; GREENBERG; YAO, 2004).

A HR está associada a uma resposta de resistência, e essa resposta de resistência envolve a ativação coordenada de defesa que limita o crescimento do patógeno. Ela é ativada quando o hospedeiro possui um gene R dominante que reconhece um gene Avr, também dominante, no patógeno de acordo com a teoria gene-a-gene proposta por Flor em 1942 (GREENBERG; YAO, 2004).

Estudos demonstram que a HR é um processo ativo no hospedeiro e em alguns casos ela necessita da ativação de síntese de proteínas para sua ativação pelo fungo (HEATH, 2000). Além disso, a HR esta sujeita ao controle genético e a morfologia de células passando por esse processo sugere, em estágios mais avançados, que é uma forma de PCD com características apoptóticas. Na interação alface-*Pseudomonas syringae* foram encontrados alterações precoces na morfologia da mitocôndria como turgescência e desorganização da crista, similar ao que ocorre em células animais. Em estágios mais avançados observou-se disfunção da membrana, evento crítico para a morte celular, e progressiva vacuolização do citoplasma. Também foi observado condensação da cromatina e clivagem endonucleotídica (JONES, 2000). Nas infecções de feijão-caupi com fungos causadores de ferrugem ocorreu clivagem endonucleotídica durante a HR (HEATH, 2000).

Além das alterações estruturais em células apoptóticas, nota-se o envolvimento de proteases na resposta de resistência e/ou durante a HR entre diversas interações planta patógeno. Em animais, essas proteases são chamadas de caspases. Já em plantas, nenhum homólogo foi identificado até o momento, mas a atividade similar à caspase de certas proteases tem sido documentada e confirmada através de estudos com inibidores de caspases/proteases (GREENBERG; YAO, 2004; HEATH, 2000).

A explosão oxidativa é uma das respostas mais precoces e mais comuns para desafiar o patógeno e tem sido correlacionada com respostas de defesa e resistência do hospedeiro (MEHDY, 1994). A regulação dos níveis de EROs

serve como uma função ampla e crucial na habilidade das células vegetais detectar e responder ao ambiente (ex. estímulo biótico e abiótico). Em baixas concentrações, EROs não são diretamente tóxicas e podem atuar como mensageiros secundários em rotas de sinalização, incluindo aquelas dentro das interações patógeno-hospedeiro (APEL; HIRT, 2004). Em contraste, altas concentrações de EROs são tóxicas, levando a danos na membrana celular e degradação do DNA, comumente ligadas a PCD. Trabalhos prévios estabeleceram a importância do ácido oxálico (AO) secretado por *Sclerotinia*, uma fitotoxina não específica, como um determinante de patogenicidade (CESSNA et al., 2000). Mutantes defectivos na síntese de AO são não patogênicos e não induzem a morte celular do tecido (GODOY et al., 1990). Com aplicação exógena de concentrações fisiológicas de AO, *Sclerotinia* retoma os sintomas da doença (morte celular). Além disso, dados sugerem que AO é um elicitor fúngico que, dependendo do tempo e da dose, induz características de morte celular similar a apoptose, incluindo DNA laddering e células reativas ao TUNEL. O oxalato também induz aumentos nos níveis de EROs (H₂O₂), que correlaciona com PCD. Quando EROs induzidas por AO são inibidas a morte celular e a doença não ocorrem. Por isso, a PCD induzida pelo fungo é essencial para a patogenicidade de *Sclerotinia* e parece ser mediada pelas EROs que ativam as rotas vegetais responsáveis pela PCD (KIM et al., 2008).

Em algumas interações entre hospedeiro e patógeno necrotrófico, a PCD tem a função de promover o crescimento do patógeno. Isso ocorre especialmente em patógenos que secretam toxinas para matar rapidamente as células do hospedeiro e promover a obtenção de nutrientes para o seu desenvolvimento. As toxinas AAL, de *Alternaria alternata* f. sp. *lycospersici* (AKAMATSU et al., 1997), e victorina, de *Cochliobolus victoriae* (CURTIS; WOLPERT, 2002), em plantas suscetíveis de tomate e aveia, respectivamente, causam uma resposta de PCD, incluindo ladders de DNA, a importação de Ca²⁺, proteases similares a caspases e um aumento na permeabilidade transitória da mitocôndria (NAVARRE; WOLPERT, 1999). Patógenos que secretam toxinas infectam apenas hospedeiros específicos. Por essa razão, AAL e victorina são consideradas toxinas hospedeiro-específica (AKAMATSU

et al., 1997; CURTIS; WOLPERT, 2002). Para confirmar que patógenos necrotróficos se beneficiam com PCD, estudos desenvolvidos com tomate carregando proteína inibidora de caspase, p35, mostrou uma diminuição dos sintomas da doença e do crescimento do *P. syringae* (LINCON et al, 2002).

2.5.3 A sinalização durante HR

Moléculas derivadas do patógeno, denominadas de elicitores, que induzem as reações de morte celular como a HR estão sendo usadas através de aplicações diretas nas células vegetais ou pela expressão de genes desses elicitores diretamente em plantas. Em alguns casos, os elicitores comportam-se como produtos Avr (HEATH, 2000).

O estresse oxidativo, os canais de íons, o NO, e a interação entre alguns desses sinalizadores provavelmente estão envolvidos no controle da HR. Porém, o papel exato destas moléculas ainda não está completamente estabelecido. A utilização de protoplastos de *Arabidopsis* e análises microscópicas permitiram estabelecer que a HR envolve uma transição na permeabilidade da membrana. Em células animais, tais transições são componentes importantes do mecanismo apoptótico devido à liberação do citocromo c (GREENBERG; YAO, 2004). Em suspensão de células de milho infectadas por *Agrobacterium*, a morte celular foi acompanhada pela liberação de citocromo c para o citoplasma (HANSEN, 2000). Além disso, alguns patógenos como o fungo *Phytophthora infestans* possuem tanto moléculas indutoras quanto inibidores de morte celular, podendo ativar parcialmente ou reverter o processo de morte em seus hospedeiros (ABRAMOVITCH et al., 2003; ESPINOSA et al., 2003).

Na interação *Arabidopsis* – *P. syringae* ocorre também a produção de NO, porém em estágios mais tardios à infecção. Portanto, é possível que o NO não seja a causa da morte das primeiras células, mas teria um papel na sinalização célula-célula e ativa a morte celular à medida que a infecção

progride (ZHANG et al., 2003). A inibição da síntese ou da ação do NO apenas atenua a HR, confirmando o seu papel (GREENBERG; YAO, 2004).

Além de desempenhar um importante papel diretamente na limitação do crescimento do patógeno, a HR mostra uma forte associação entre a morte celular e a ativação de defesas específicas nos tecidos adjacentes, contribuindo para a sinalização e protegendo as plantas de futuras infecções. Plantas que desenvolvem uma HR depois da infecção com *P. syringae* exibem uma resistência sistêmica muito mais forte a um ataque subsequente do patógeno (SHAPIRO; ZHANG, 2001).

2.5.4 A regulação da morte celular programada em plantas

Embora a morte de células vegetais compartilhe similaridades com a apoptose animal, o exame do genoma completo de *Arabidopsis* bem como outros genomas parciais ou quase completos de plantas pelas ferramentas BLAST e FASTA não revelou, até o momento, nenhum homólogo para o conjunto de reguladores de PCD em animais. Isto sugere um alto nível de divergência entre essas seqüências. Porém, se tais genes de plantas existem são necessárias outras estratégias para identificar genes candidatos. Análises de genômica funcional e/ou abordagens avançadas de bioinformática são usadas para este propósito (WILLIAMS; DICKMAN, 2008).

A abordagem informática focada na similaridade estrutural pode propor uma similaridade funcional. Isso permite que proteínas sem homologia de seqüência ou com pouca homologia, mas que compartilham características chave (ex. sítios catalíticos, dobramentos, estrutura helicoidal, hidrofobicidade, superfícies acessíveis a água, potencial eletrostático), possam ter uma função proposta independentemente da seqüência primária. Assim, diversas seqüências primárias de aminoácidos podem resultar em uma proteína com dobramento comum importante para a regulação da morte celular, talvez explicando a incapacidade em detectar homólogos em genomas de plantas, baseadas na comparação de seqüências (WILLIAMS; DICKMAN, 2008).

De acordo com esta abordagem, foi descoberta e caracterizada a família da proteína BAG de *Arabidopsis thaliana* (At). As proteínas BAG de mamíferos são uma família de reguladoras de chaperona que modulam diversos processos que vão desde a proliferação até interrupção do crescimento e morte celular. Elas são distinguidas por um domínio BAG conservado, que interage com proteínas Hsp70 e Hsc70 para regular a atividade. Pesquisas da seqüência do genoma de At revelaram sete homólogos da família de proteínas BAG com similaridade de seqüência limitada em humanos. Estruturalmente, entretanto, essas proteínas foram altamente similares e contendo possíveis sítios de ligação Hsp 70 (DOUKHANINA et al., 2006).

Em outras análises, novos genes que suprimem as rotas de morte celular tem sido descobertos pelo uso destes métodos em células animais, e já se iniciou a tentativa de estender esta abordagem aos genomas de plantas. A principal análise baseada na função é a expressão ectópica do Bax de mamíferos.

O Bax é um regulador positivo da morte celular, por formar poros na membrana da mitocôndria e, conseqüentemente, promover a liberação do citocromo C (SUOMENG et al., 2008). Em contraste, o gene Bax Inibidor-1 (BI-1) protege a célula do efeito proapoptótico do gene Bax (KAWAI-YAMADA et al., 2004).

O BI-1 em plantas é expresso em vários tecidos e seu nível de expressão é aumentado durante a senescência e sob diversos tipos de estresses tanto biótico quanto abiótico (BOLDUC et al., 2003; HÜCKELHOVEN et al., 2003; KAWAI-YAMADA et al., 2004b; MATSUMURA et al., 2003; SANCHEZ et al., 2000). A superexpressão de BI-1 de várias espécies de plantas mostrou suprimir a morte celular induzida por estresse abiótico ou pelo gene Bax, em uma variedade de células de diferentes organismos. (BOLDUC et al., 2003; CHAE et al., 2003; KAWAI-YAMADA et al., 2001, 2004; MATSUMURA et al., 2003)

Diversos estudos demonstram que alterações na expressão do gene BI-1 podem ser decisivas na sobrevivência ou da planta ou do patógeno, já que este gene está envolvido no processo de PCD (Figura 8).

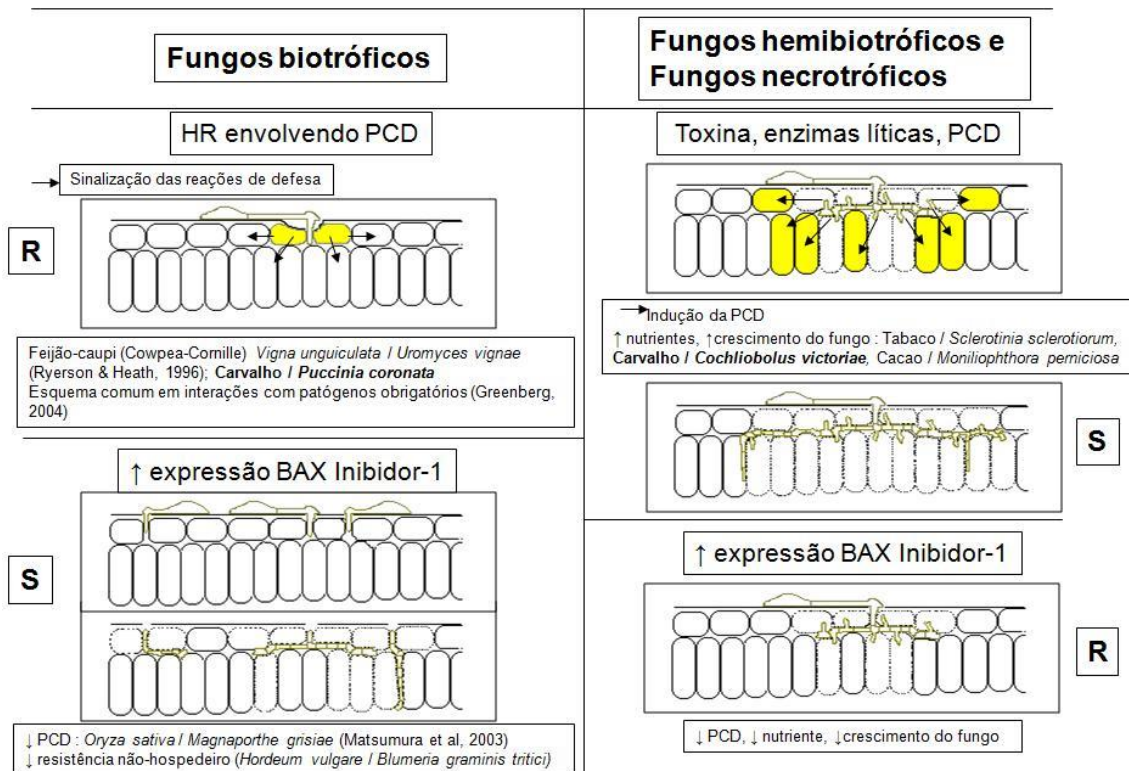


Figura 8. Quadros de resistência ou suscetibilidade em interações com fungos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos em resposta à superexpressão do gene BAX inibidor-1.

Chae et al. (1993) demonstraram que a superexpressão de um homólogo de BI-1 de leveduras protegem as células da morte celular induzida por Bax e do estresse oxidativo, enquanto que células de leveduras deficientes de BI-1 foram mais sensíveis a esses estresses. De uma maneira muito interessante, a supressão de BI-1 em células de arroz tratadas com elicitores do fungo *Magnaporthe grisea* foi concomitante com a progressão da morte celular, e, inversamente, a superexpressão desse gene melhorou a sobrevivência das células contra este elicitor (MATSUMURA et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Três genótipos clonais com fenótipos distintos de resistência foram estudados: PB314, suscetível a todos os isolados de *M. ulei*; MDF180, parcialmente resistente aos isolados de *M. ulei*; e FX2784, que apresenta todos os fenótipos (susceptibilidade, resistência parcial ou resistência total) dependendo dos isolados de *M. ulei*.

3.2 Inoculação e obtenção das amostras

3.2.1 Inoculação

Histologia e TUNEL: plantas enxertadas e cultivadas em casa telada na PMB (Ituberá) serviram para as inoculações. A face inferior de folhas jovens antociânicas dos genótipos PB314, MDF180 e FX2784 foram inoculadas com uma suspensão de 1×10^6 esporos de *M. ulei*.ml⁻¹, acrescida de Tween 80 0.5%, provenientes de lesões recém esporuladas obtidas de genótipos suscetíveis inoculados com isolados (PMB86, PMB88, PMB109) esporulados em meio de cultura segundo Mattos (1999). Plantas controles foram inoculadas com uma suspensão contendo água e tween 80 0.5%. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida por 12 dias, com fotoperíodo de 12 h, temperatura de 23 a 25°C e umidade de 95% para favorecer a germinação e penetração no hospedeiro a fim de estabelecer a infecção.

3.2.2 Coleta das amostras

Histologia e TUNEL: folhas inoculadas e não inoculadas foram coletadas 12, 24, 48, 96, 168, 240 hai. em frascos de vidro contendo glutaraldeído 1%, paraformaldeído 2% e cafeína 1% em PBS (NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 150mM, pH 7,2), permaneceram 10 min no vácuo e foram submetidas a 4 horas de fixação. Após este período, as amostras foram armazenadas em etanol 70% a 4°C.

Fragmentação do DNA e macroarranjos: folhas de seringueira infectadas foram coletadas do Jardim Clonal (infecções naturais) da PMB em três estágios de desenvolvimento foliar (B₂, C e D – Figura 2) e de lesões com idades diferentes (novas, intermediárias e velhas). As folhas não inoculadas foram obtidas das plantas enxertadas e cultivadas em casa telada. As amostras utilizadas para extração de DNA foram congeladas em nitrogênio líquido (N₂), liofilizadas e armazenadas a -80°C. O material selecionado para extração de RNA foi transferido para tubos contendo RNeasy® (Qiagen) e, posteriormente, congelado em N₂, liofilizado e armazenado a -80°C.

3.3 Análises histológicas

3.3.1 Preparação do material vegetal para inclusão em resina

Folhas jovens de *Hevea brasiliensis* inoculadas com *Microcyclus ulei* e não inoculadas, armazenadas em etanol 70%, foram desidratadas em etanol 85% e 95% utilizando bomba a vácuo por 3 min, com intervalos de 20 min. entre cada etapa. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma solução de resina (resina e ativador) e etanol 95%, onde permaneceram por três dias seguidos por um dia em historesina Leica.

Posteriormente as amostras foram incluídas em historesina Leica (solução de resina e polimerizador) e mantidas em estufa a 45°C por dois dias.

Os blocos de resina foram montados em suporte de madeira e permaneceram na estufa a 45°C.

3.3.2 Corte e montagem das lâminas

As secções transversais foram feitas em micrótomo rotativo Leica RM 2145, com espessuras de 3 µm. Os cortes foram distribuídos em lâminas contendo gotas de água para a distensão do material. Após a secagem do excesso de água em temperatura ambiente, as lâminas foram mantidas na estufa a 45°C por três dias.

3.3.3 Coloração do material

A coloração selecionada foi a dupla coloração ácido periódico e reativo de Schiff (PAS) + Naphthol Blue Black. Lâminas contendo os cortes de folhas de seringueira foram cobertas com uma solução de ácido periódico 1% por 5 min à temperatura ambiente. Após, as lâminas foram lavadas com água destilada. Antes de passar para a próxima etapa as lâminas foram mantidas na bancada até secar completamente. Em seguida, pingou-se uma gota de reativo de Schiff, cobriu-se os cortes com uma lamínula e deixou-se corar no escuro por 10 min à temperatura ambiente. Seguido deste corante, a lamínula foi retirada e as lâminas foram cobertas com uma solução de água sulfurosa (5ml de metabissulfito de sódio 5%, 5ml de ácido clorídrico 1N e 90ml de água destilada) por 4 min. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada até que a água se tornasse incolor. Os cortes foram corados com a segunda coloração, Naphthol Blue Black, por 5 min a 50°C. Após coradas, foram lavadas em água destilada. Quando necessário, a coloração foi regredida com ácido acético 7%, lavando-se com água destilada e observando-se no microscópio até que as paredes retornassem à coloração avermelhada do Schiff.

Depois de secas, as lâminas foram montadas em Bálsamo do Canadá e mantidas em estufa a 45°C por dois dias.

Os cortes foram analisados em microscópio fotônico e aqueles mais representativos foram fotografados em câmera digital Olympus C-7070.

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

3.4.1 Preparação do material vegetal para inclusão em parafina

Folhas jovens de *Hevea brasiliensis* inoculadas com *Microcyclus ulei* e não inoculadas, armazenadas em etanol 70%, foram desidratadas por meio de uma série de etanol (80%, 90% e 100%) e por outra série de butanol terciário – etanol (50%, 70%, 85%, 95% e 100%) em bomba a vácuo por 3 min, com intervalos de 20 min entre cada etapa. Posteriormente, as amostras foram imersas em álcool butílico terciário P. A., com trocas nos intervalos de 2 horas, por três vezes, e transferidas para uma solução contendo butanol e óleo de parafina, permanecendo *overnight*. Subseqüentemente, metade dessa solução foi descartada, acrescentando-se parafina e mantida a 60°C por 2 horas. Novamente, metade da solução foi descartada e acrescentou-se parafina, permanecendo por mais 2 horas a 60°C. Por último, foram feitas 2 trocas totais de parafina a 60°C, com intervalos de duas horas cada.

As amostras foram incluídas em parafina e mantidas a 4°C por dois dias. Os blocos de parafina foram montados em suporte de madeira, lapidados manualmente e mantidos a 4°C.

3.4.2 Corte e montagem das lâminas

As secções transversais foram feitas em micrótomo Leica RM 2145, com espessura de 8µm e montadas em lâminas contendo Adesivo de Haupt e água destilada. As lâminas foram colocadas em placa levemente aquecida para a distensão do material e mantidas na estufa a 45°C por 5 dias.

3.4.3 Desparafinação e rehidratação

As secções foram desparafinadas por imersão em xilol durante 15 min por duas vezes. A rehidratação foi feita por uma série decrescente de etanol (100%, 95%, 90%, 85%, 80% e 70%) durante 5 min e por duas vezes em cada álcool a temperatura ambiente, seguida de água destilada durante 3 min por duas vezes.

3.4.4 Permeabilização e detecção da fragmentação do DNA

As lâminas, contendo os cortes de folhas de seringueira, foram lavadas cinco vezes, por 10 min cada lavagem em tampão PBS (NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) à temperatura ambiente e incubados por 30 min a 37°C em uma solução contendo pectinase 4% (E.C. 3.2.1.15, Sigma) e celulase Onozuka R-10 (Merck) a 2% em PBS. Em seguida, foram novamente lavadas em PBS por 5 min e incubadas por 20 min em metanol e ácido acético 1% (1:1) (CEITA, 2004, Vania, 2007). Após mais uma lavagem em PBS por 5 min, houve a incubação em solução de permeabilização, Triton X-100 0,1% e citrato de sódio 0,1% durante 8 min (Roche). Posteriormente, os cortes foram lavados duas vezes em PBS, por 5 min para cada lavagem. Logo após as lavagens, as secções foram imersas em tampão TDT (Trisma base 30 mM, cacodilato de sódio 140 mM e cloreto de cobalto 1 mM, 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. Posteriormente, adicionou-se às lâminas contendo as secções de folha a *TUNEL reaction mixture* (solução de sondagem + solução enzimática do kit). Logo após, as lâminas foram incubadas em câmara úmida (placa de Petri com algodão umedecido em água) por 60 min a 37°C. Após este período de incubação, os cortes foram imersos em tampão TB (NaCl 300 mM, citrato de sódio 30 mM, pH 8,5) por 15 min a 37°C e lavados duas vezes em PBS à temperatura ambiente. Os cortes referentes ao controle positivo foram tratados com DNase I (3U/ml em 50 mM de Tris-HCl, pH 7,5) por 10 min à temperatura ambiente.

Os cortes sondados com TUNEL foram observados em microscópio de fluorescência Leica DM RXA2, equipado com câmera digital Leica MPS 60. As imagens foram capturadas utilizando-se o filtro I3 (450-490 nm de excitação).

Núcleos TUNEL-positivos fluorescem verde ou amarelo, tornando possível a observação da fragmentação do DNA.

3.5 Análise da fragmentação do DNA

3.5.1 Extração de DNA e eletroforese em gel de agarose

As extrações de DNA de folhas infectadas e sadias de seringueira foram realizadas segundo o protocolo modificado de Besse et al. (1994). Cerca de 400mg de material vegetal fresco foi congelado e macerado em N₂ e transferido para tubos contendo 5ml de tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1,4M, EDTA 20mM, Tris HCl 100mM pH8, PVP 2%, β-mercaptoetanol 0,2% e proteinase K 20µg/ml). Os tubos foram agitados no vórtex por 30 s e mantidos em banho-maria por 40 min a 65°C, com agitações a cada 10 min. Após, o material foi centrifugado a 13.400 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi recuperado e acrescentado a ele 800µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v), por duas

vezes seguido de agitação vigorosa por 2 min. O material foi novamente centrifugado a 13.400 rpm por 5 min e a primeira fase do material foi recuperada. A precipitação do DNA foi realizada com isopropanol (isopropanol:sobrenadante, v/v) de um dia para o outro a 4°C. No dia seguinte, após a centrifugação, o *pellet* foi lavado com 300µl de etanol 70% e 96%, por duas vezes cada. Depois da secagem completa do *pellet*, o mesmo foi ressuscitado em 30µl de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH8) sendo quantificado por espectrofotometria com $ABS_{(260/280)}$. O tratamento do DNA com RNase (Fermentas), foi retirado do protocolo, pois ocasionou degradação do DNA.

Para verificação do possível padrão de fragmentação do DNA em células de folhas de seringueira infectadas com *M. ulei*, procedeu-se eletroforese em gel de agarose 2%. O gel foi posteriormente corado com uma solução de TAE contendo brometo de etídio (BrEt), $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, durante 20 min., visualizado em transiluminador UV (Vilber Loumart) e fotografado em sistema de fotodocumentação EDAS-290 (Kodak).

3.6 Análise da expressão gênica via macroarranjos

3.6.1 Os macroarranjos

Os macroarranjos constituídos de 2575 produtos de PCR produzidos a partir dos clones bacterianos das bibliotecas SSH da interação *Hevea-Microcyclus ulei* foram utilizados nos estudos de expressão (Garcia D., artigo em preparação).

3.6.2 Extração de RNA total

Para extração de RNA foram coletadas lesões de folhas de seringueira nos estágios B2, C e D dos genótipos MDF180 e PB314. Cerca de 70 mg de material liofilizado e transferido para microtubos contendo 500µl de tampão Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). Os tubos foram agitados no vórtex até completa homogeneização e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Após o material foi centrifugado a 12.000g e 4°C durante 20 min. O sobrenadante foi recuperado e a ele acrescentado 100µl de NaCl 5M, 300µl de CIAA 24:1 (clorofórmio: álcool isoamílico, v:v) com agitação durante 5 min. O material foi novamente centrifugado e o sobrenadante recuperado. Acrescentou-se isopropanol (v:v) seguido de agitação no vórtex e incubação por 10 min. a 4°C para a precipitação do RNA. Após nova centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1ml de etanol. Centrifugou-se novamente. Depois que o *pellet* estava seco, o mesmo foi ressuscitado em 21µl de água DEPC autoclavada. Para verificar a integridade do RNA procedeu-se eletroforese em gel de agarose 1% corado com BrEt (10mg.ml⁻¹).

3.6.3 Tratamento com DNase

Para 20µl de RNA foi adicionado 5µl de DNase I, 1µl de inibidor de RNase (RNase out – Fermentas) e 50µl de água DEPC autoclavada e incubou-se em banho-maria a 37°C durante 30 min. Após incubação, os tubos foram transferidos para o gelo por 5 min. Acrescentou-se 150µl de água DEPC e 200µl de PCIAA 25:24:1 (fenol tamponado:clorofórmio:álcool isoamílico, v:v:v) e agitou-se os tubos. Após, o material foi centrifugado a 12.000g a 4°C por 15 min. Recuperou-se a primeira fase e acrescentou-se acetato de sódio 3M (1:10) e etanol absoluto (2,5v), seguido de agitação e incubação durante 5 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 14.000g a 4°C durante 30 min e, posteriormente, descartou-se o sobrenadante. Em seguida o *pellet* foi

lavado com 1ml de etanol 70% e centrifugado a 12.000g a 4°C durante 15 min. E acrescentou-se, novamente, 50µl de etanol 70% para o transporte do RNA para o CIRAD (Montpellier, França), onde foram desenvolvidas as etapas de marcação com P³³ e hibridação das membranas. Antes de passar para as próximas etapas, a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com BrEt (Figura 9).

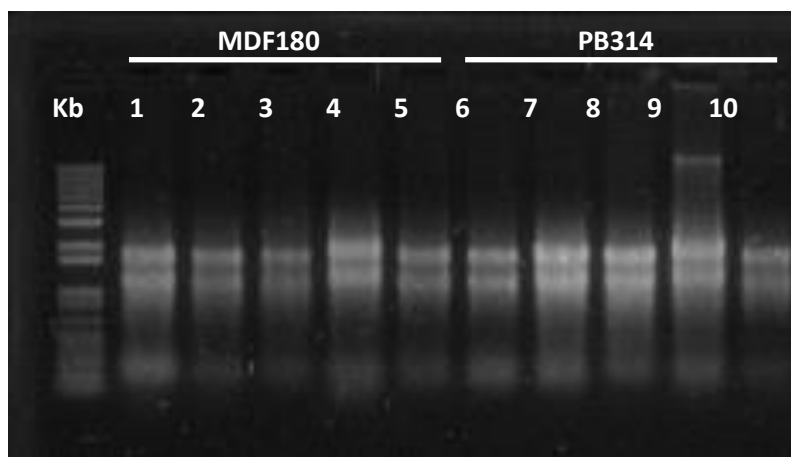


Figura 9. Amostras de RNA total (tratados por DNase) em gel de agarose 1% de folhas de seringueira de lesões de estágio foliar B2 (1, 6), C (2, 7) e D (3, 8) e de folhas sadias de plantas recém enxertadas e mantidas em casa telada nos estágios C(4, 9) e D (5, 10) dos genótipos MDF180 e PB314.

3.6.4 Marcação dos cDNAs alvos e hibridação do arranjos

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a PrimerScriptTM Reverse Transcriptase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) com 4 mg de RNA total segundo às recomendações do fornecedor. As membranas de nylon foram hibridadas 24h, 65°C com cDNA alvos marcados com P³³. Após hibridação e lavagem, as membranas foram colocadas em contato com o Storage Phosphor Screen (Amersham Bioscience) por três dias. O sinal impresso na tela foi digitalizado com o Phosphor Image Storm (Amersham Bioscience) e analisado com o programa ImageQuant TL (Amersham).

3.6.5 Análise estatística das hibridações dos macroarranjos

A partir dos sinais iniciais, um método não paramétrico baseado na identificação de um Self-Consistent-Set (SCS) foi utilizado (DAWES & GLASSEY, 2007). O SCS representa todos os genes com uma expressão estável qualquer que seja as condições fisiológicas testadas (com ou sem inoculação), o estágio de desenvolvimento da lesão (jovem, intermediária ou velha) e os genótipos (MDF180 ou PB314). Na intensidade média de cada sinal foi subtraído o *background*. O valor final foi normalizado em relação à soma da intensidade do SCS spots. A diferença de expressão entre o clone resistente (R) e suscetível (S) foi determinado segundo o índice M calculado a partir da fórmula a seguir:

$$M = \log_2(R/S)$$

Dos 1301 cDNAs depositados na membrana, genes com sinal superior a 2 ou inferior a -2 foram selecionados como diferencialmente expressos. Foi utilizado o software CLUSTER package para as análises hierárquicas em função do perfil de expressão e os resultados foram visualizados com o software TreeView (EINSEN et al., 1998).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação sintomatológica

A sintomatologia produzida em folhas de seringueira, decorrente da inoculação artificial por *M. ulei*, foi analisada em câmara de inoculação até 10 dai. Os genótipos PB314 (Figuras 10A, D e G), MDF180 (Figuras 10B, E e H) e FX2784 (Figuras 10C, F e I) apresentaram sintomas distintos. A avaliação dos sintomas foi baseada em uma escala de notas, como descrito na tabela 3.

Tabela 3. Escala de notas para avaliação dos sintomas do mal-das-folhas (Adaptado de Mattos et al., 2003).

Tipo de resistência	Nota	Tipo de lesão
Resistente	1	Lesão clorótica sem esporulação
	2	Lesão necrótica sem esporulação
Parcialmente resistente	3	Esporulação parcial ao redor da lesão
	4	Esporulação parcial na lesão
Suscetível	5	Esporulação abundante na face abaxial
	6	Esporulação abundante na face abaxial e adaxial

Os primeiros sintomas apareceram por volta dos 120 hai. O clone PB314, 168 hai., apresenta diversas lesões com notas 5 e 6 (Figura 10D). O mesmo é observado em 240 hai, porém com uma esporulação maior (Figura 10G). Já, 168 hai, MDF180, apresenta lesões mais claras correspondendo a uma esporulação mais fraca do fungo, ou seja, notas 3 e 4 (Figura 10E). Essas lesões podem escurecer correspondendo a um aumento do número de

conidióforos, porém a esporulação das lesões é inferior ao clone mais suscetível (Figura 10H). Em FX2784, a sintomatologia apresentada é muito particular: tanto em 168 hai quanto em 240 hai as lesões são significativamente reduzidas em número e tamanho, com nota 1, caracterizando uma HR (Figuras 10F e I). As folhas não inoculadas não apresentaram nenhum sintoma (Figuras 10A, B e C).

FX2784 apresentou os diferentes fenótipos durante as inoculações. Porém, na maioria delas mostrou-se resistente, embora essa resistência tenha sido quebrada muito facilmente. Por essa razão, algumas análises para este clone, quando possível, teve que ser diferenciada em decorrência do aparecimento de sintomas tardios e muito reduzidos.

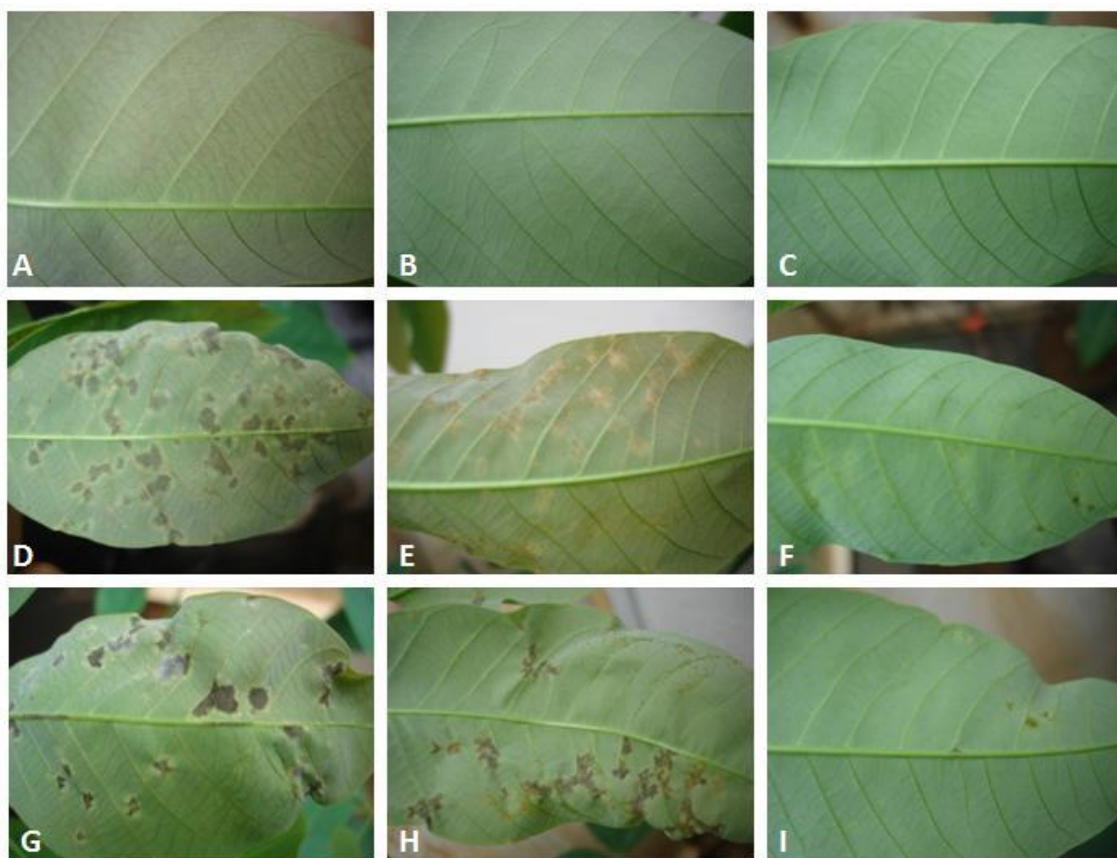


Figura 10. Evolução dos sintomas em folhas de seringueira infectadas com *M. ulmi*. A, D e G – Folhas sadia e infectadas do clone PB314. A – Folha não infectada. D e G – Lesões esporulantes e enrugamento do limbo foliar, 168 e 240 hai, respectivamente. B, E e H - Folhas sadia e infectadas do clone MDF180. B – Folha não infectada. E e H – Lesões com

esporulação mais fraca (cor mais clara) que em PB314, e com enrugamento foliar menos severo, 168 e 240 hai, respectivamente. C, F e I – Folhas sadia e infectadas do clone FX2784. C – Folha não infectada. F – Lesões em tamanho e número bastante reduzidos, 168 hai. I – Pequenos lesões que não evoluem aos 240 hai.

4.2 Reações tissulares precoces de folhas de *Hevea brasiliensis* infectadas por *Microcyclus ulei*.

As folhas infectadas por *M. ulei* foram primeiramente processadas em parafina. As secções transversais, com 8-10 μ m, foram coradas com safranina e azul de Astra. As análises do material revelaram cortes espessos, havendo muita sobreposição de células.

Partiu-se então para a inclusão das amostras em resina e coloração do material com Azul de Toluidina, que é um corante metacromático que cora de azul-esverdeadas as paredes lignificadas e, em tons róseos a roxo as paredes celulósicas e o núcleo. As secções transversais de 3 μ m permitiram uma boa visualização dos tecidos foliares. Das amostras processadas em tempos inferiores ao aparecimento de sintomas, somente em duas amostras, coletadas em 24 hai, foram obtidos cortes contendo o fungo (Figura 11B e D). Neste tempo não foi possível a visualização de hifas no tecido foliar e os tecidos infectados apresentaram-se íntegros como os tecidos sadios (Figura 11A e C). Por estas razões, optou-se por processar as amostras coletadas a partir de 168 hai, pois apresentavam sintomas.

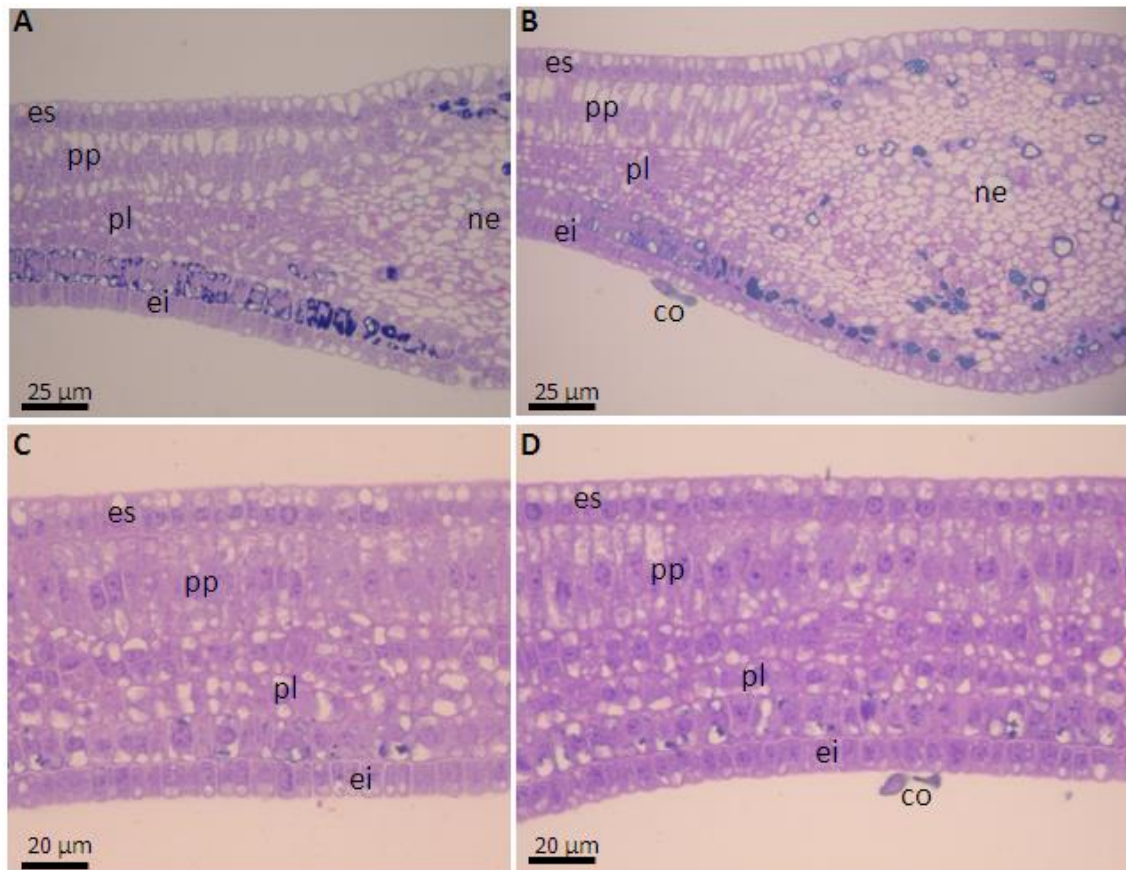


Figura 11. Secções transversais (3 μm) de folhas de seringueira 24 hai com *M. ulei*, coradas com azul de toluidina. A e C – Tecidos foliares saudáveis de PB314 e MDF180, respectivamente. B e D – Secções de folhas infectadas, onde verifica-se a presença do fungo, mas nenhuma alteração tissular em decorrência da infecção, tanto em PB314 (B) quanto em MDF180 (C). Legendas – es: epiderme superior; pp: parênquima paliádico; pl: parênquima lacunoso; ei: epiderme inferior; ne: nervura; co: conídios.

Em amostras coletadas 168 hai foi possível visualizar a colonização dos tecidos foliares de seringueira por *M. ulei*. Porém, a coloração mostrou-se pouco contrastante entre tecido foliares e hifas do fungo (Figura 12A e B), limitando a distinção entre patógeno e hospedeiro. Embora quase todas as amostras tenham sido processadas dessa forma continuamos buscando outras alternativas para melhorar o trabalho.

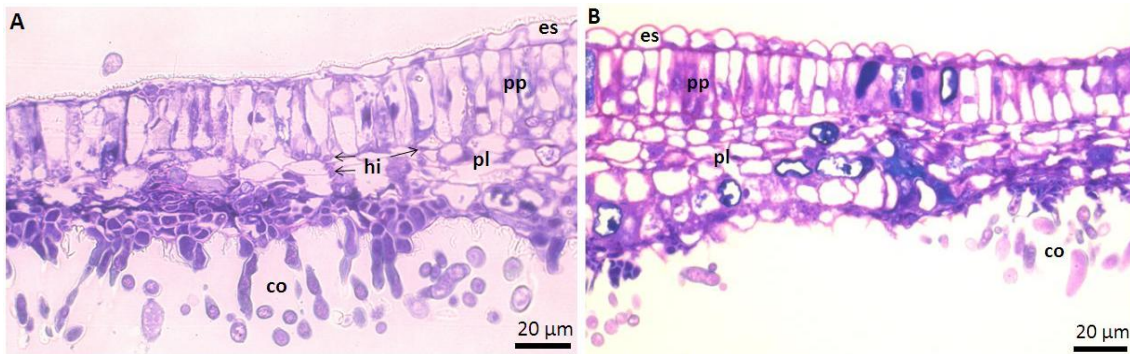
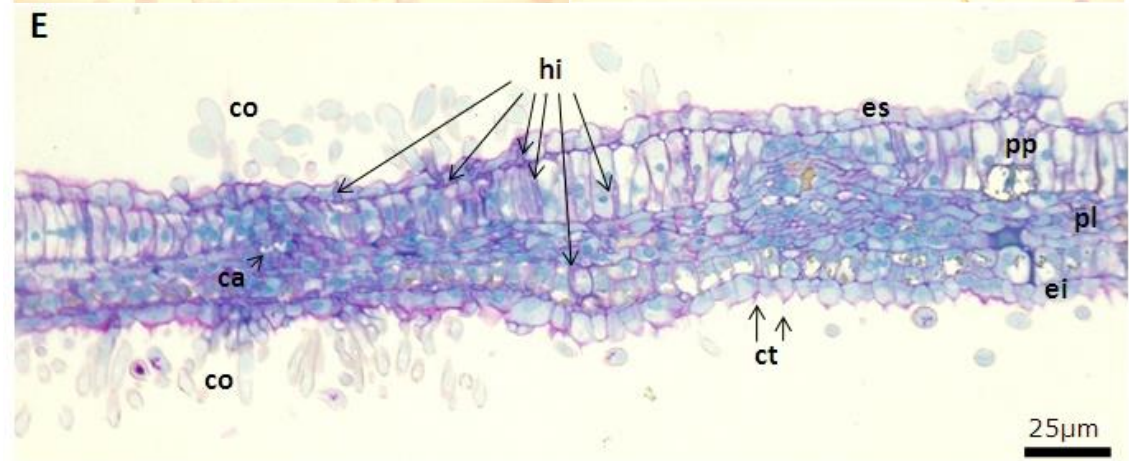
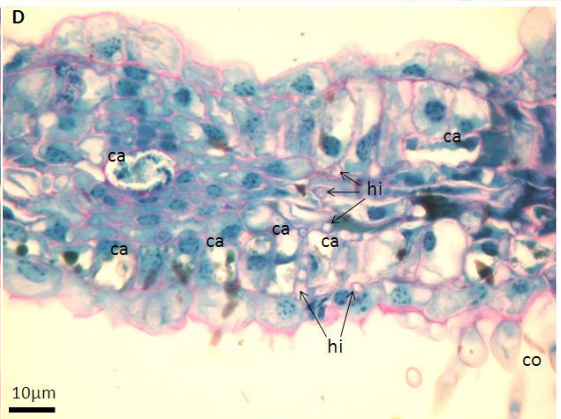
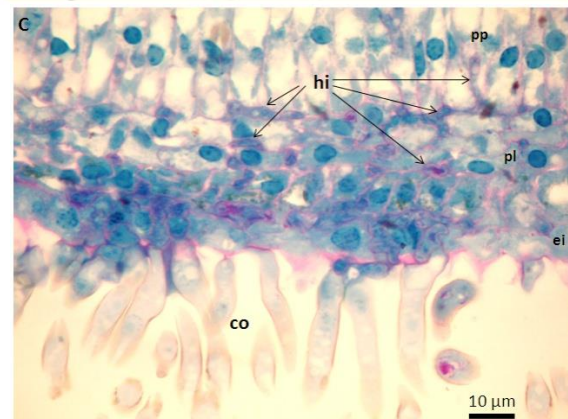
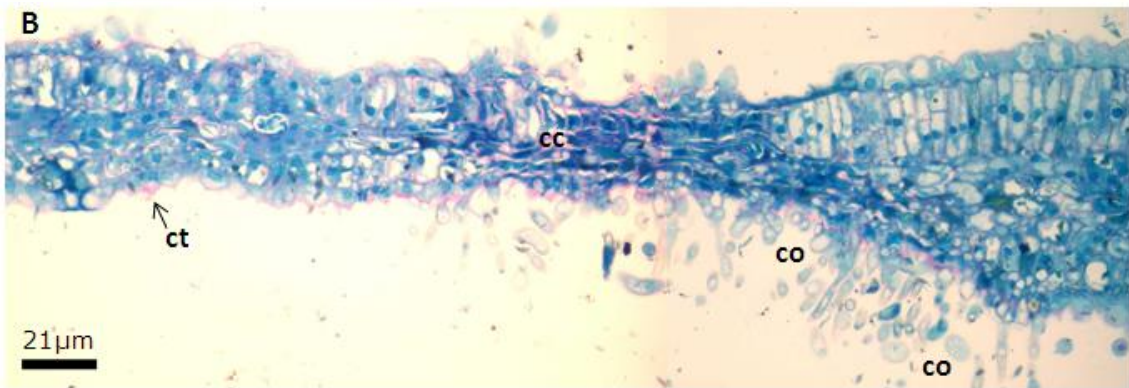
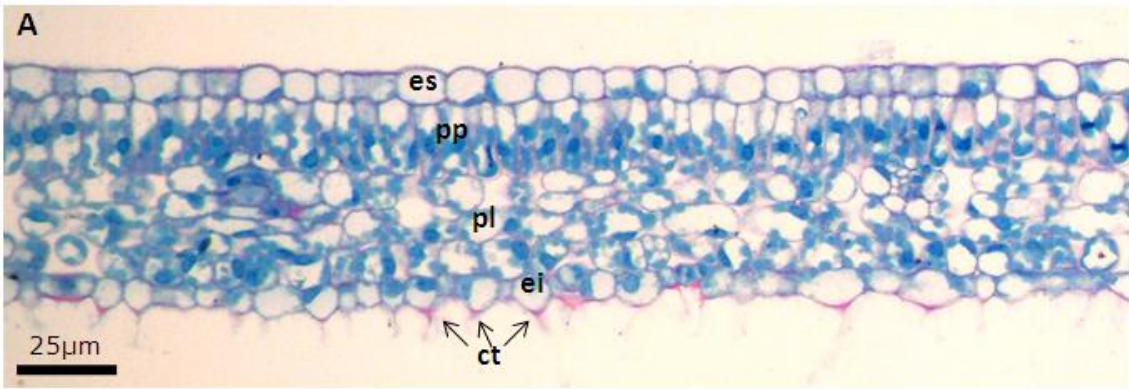


Figura 12. Secções transversais (3 µm) de lesões em folhas de seringueira 240 hai, coradas com azul de toluidina. A – Tecidos foliares de PB314 infectados por *M. ulei*. Notam-se tecidos bastante degradados e colapso das células epidérmicas e do parênquima paliçádico. É possível distinguir apenas poucas hifas (hi) entre as células. B – Tecidos foliares infectados de MDF180. A degradação dos tecidos é semelhante ao PB314, porém menos severa, e a esporulação é bem reduzida. Não foi possível a distinção de hifas intercelulares.

Por fim, a coloração utilizada foi PAS + *naphthol blue black* que permitiram uma coloração diferente dos tecidos do patógeno e do hospedeiro. As folhas infectadas por *M. ulei* e analisadas histologicamente em 168 e 240 hai estão representadas nas Figuras 13, 14 e 15.

A Figura 13A apresenta secção transversal de folhas de plantas não inoculadas (controle), com tecidos íntegros. As Figuras 13B - G representam secções transversais de uma lesão foliar causada 168 hai, em PB314. Observa-se a presença de conídios na face abaxial e pouca esporulação na face adaxial. Os tecidos aparecem bastante degradados em virtude da necrose foliar nos locais colonizados pelo fungo. Verifica-se a presença de células com características apoptóticas, como condensação e desestruturação do núcleo, vacuolização e granulação do citoplasma.



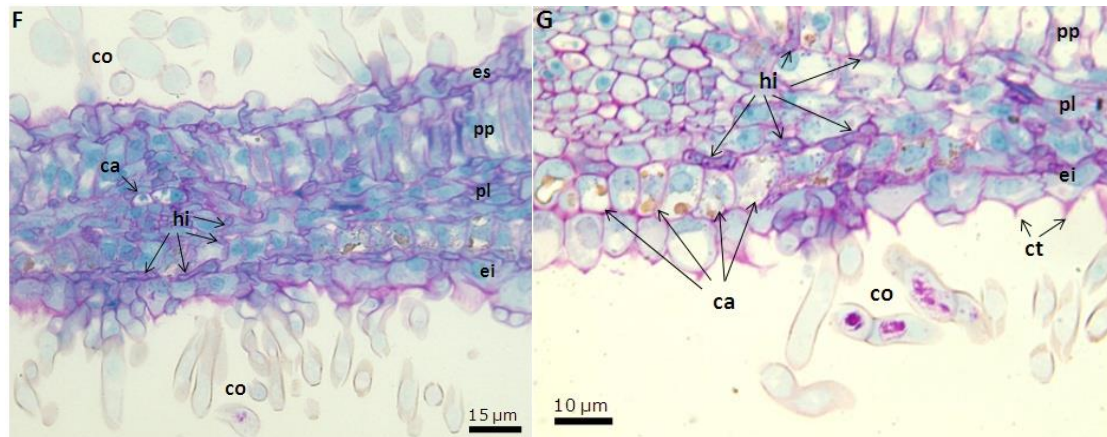


Figura 13. Secções transversais de folhas de seringueira de PB314, coradas com PAS + *naphthol blue black*. A: Secção transversal de folha não infectada, mostrando epidermes superior e inferior (es e ei), e parênquimas paliçádico e lacunoso (pp e pl) bem preservados. Cutícula (ct) na superfície abaxial. B – G: Secções transversais de lesão e folhas infectadas por *M. ulei*, 168 hai B: Tecidos completamente degradados com colapsos celulares (cc). Diversos conídios (co) na superfície abaxial. C: Detalhe da secção mostrando a localização de hifas intercelulares (hi). D: Detalhe de hifas intercelulares e células com características apoptóticas (ca), como desestruturação do núcleo, vacuolização e granulação do citoplasma. E: Secção transversal de lesão com células desestruturadas em função da colonização bem sucedida do fungo. Observa-se a presença de muitas hifas no mesófilo foliar. F e G: Detalhe da lesão evidenciando as hifas intercelulares e células apoptóticas.

A Figura 14A, apresenta secção transversal de folhas de plantas não inoculadas (controle). As Figuras 14B – D representam secções transversais de uma lesão foliar desenvolvida até 168 hai em MDF180. Observa-se a presença de conídios apenas na face abaxial. Diferentemente do clone suscetível, PB314, os tecidos do mesófilo no clone MDF180 aparecem praticamente íntegros nos locais infectados.

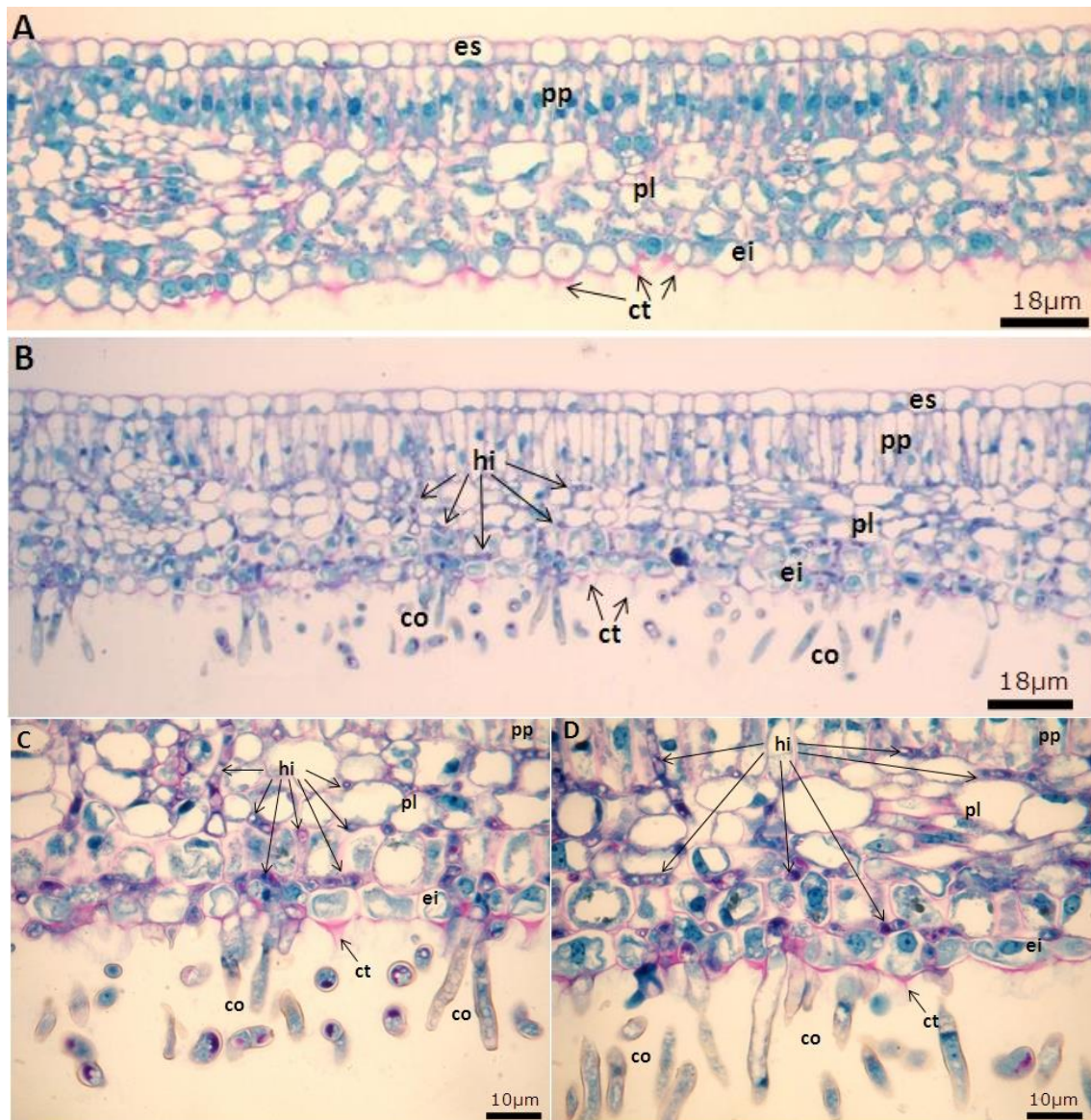


Figura 14. Secções transversais de folhas de seringueira de MDF180, coradas com PAS + *naphthol blue black*. A: Secção transversal de folha não infectada, mostrando epidermes superior e inferior (es e ei), e parênquimas paliçádico e lacunoso (pp e pl) bem preservados. Cutícula (ct) na superfície abaxial. B – D: Secções transversais de lesão e folhas infectadas por *M. ulei*, 168 hai B: Tecidos colonizados pelo fungo, mas com estruturas bem preservadas. Conídios (co) na superfície abaxial. C e D: Detalhe da secção mostrando a localização de hifas intercelulares (hi).

No clone FX2784, das inoculações realizadas até o momento de processamento das amostras, apenas uma inoculação desenvolveu sintomas por volta de 240 hai. Observa-se, nos cortes em secção transversal de folhas

inoculadas, a presença de conídios na face abaxial e pouca esporulação na face adaxial, mas os tecidos permanecem íntegros (Figura 15B). Nota-se, também, o espessamento das paredes de algumas células que estão em contato com as hifas (Figura 15C). A coloração PAS + *Naphthol Blue Black* evidenciou as hifas intercelulares do fungo (Figura 15B e C).

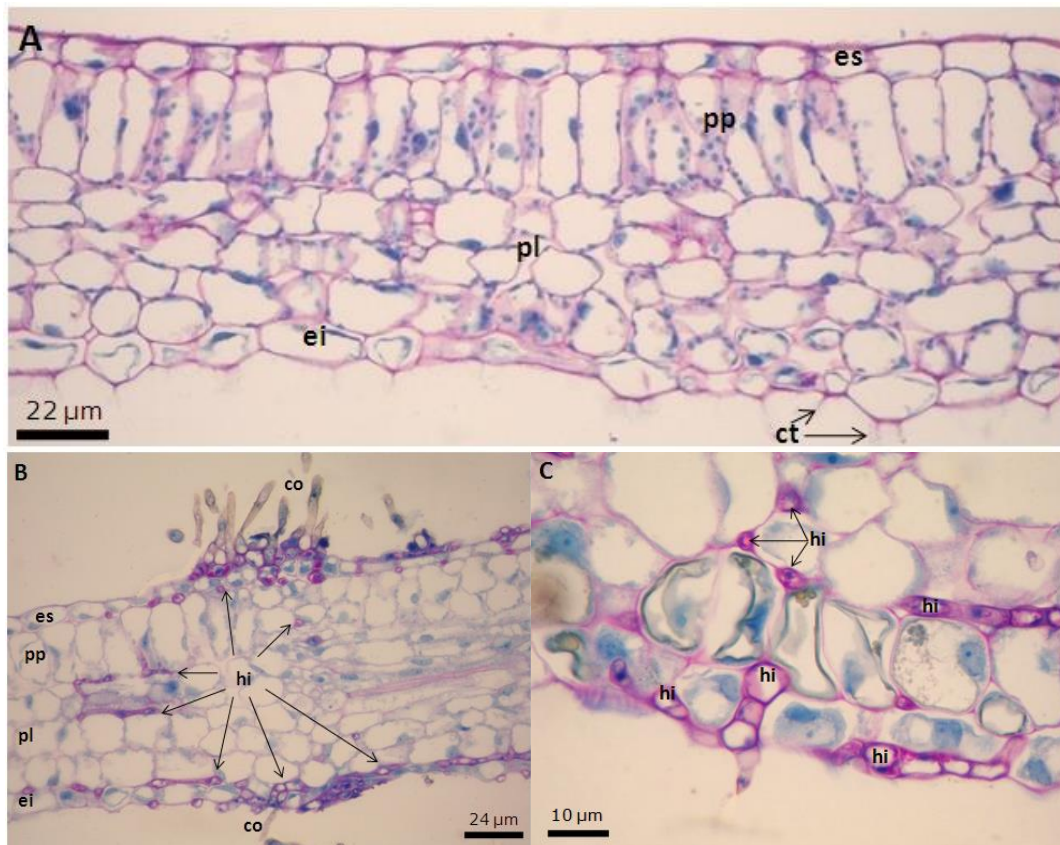


Figura 15. Secções transversais de folhas de seringueira de FX2784, coradas com PAS + *naphthol blue black*. A: Secção transversal de folha não infectada, mostrando epidermes superior e inferior (es e ei), e parênquimas paliádico e lacunoso (pp e pl) bem preservados. Cutícula (ct) na superfície abaxial. B e C: Secções transversais de lesão e folhas infectadas por *M. ulei*, 240 hai. B: Tecidos colonizados pelo fungo, mas com estruturas íntegras. Esporulação quase inexistente. A secção motra apenas um conídio (co) na superfície abaxial. C: Detalhe da secção mostrando a localização de hifas intercelulares (hi).

A coloração utilizada permitiu pela primeira vez uma distinção nítida entre os tecidos da planta e do patógeno, demonstrando a localização intercelular das hifas de *M. ulei*.

4.3 Análise da fragmentação do DNA em gel de agarose

Durante o processo de morte celular, endonucleases clivam o DNA entre os nucleossomos, gerando fragmentos de DNA que diferem no tamanho em aproximadamente 180 pares de base. Esses fragmentos podem ser visualizados através do isolamento do DNA genômico submetido à eletroforese em gel de agarose.

Seguido a extração de DNA procedeu-se a o tratamento com RNase. Porém, foi observados em todas as amostras tratadas com RNase o mesmo padrão de bandas (Figura 16), sugerindo que a RNase (Fermentas) possuía uma ação de endonuclease. Para confirmar este resultado, procedeu-se eletroforese de amostras de DNA sem tratamento com RNase. Nenhum padrão de bandas foi observado nessas amostras (Figura 17), confirmando que a RNase (Invitrogen) gerava um resultado falso-positivo. Um segundo problema a ser resolvido foi a coloração do gel. Para as amostras não tratadas, o brometo de etídio corava fortemente o acúmulo de RNA, enquanto a coloração do DNA ficava mais fraca e não era possível evidenciar a ocorrência ou não de bandas. A alternativa foi deixar as amostras migrarem até que o RNA saísse do gel, a fim de intensificar a coloração do DNA. Quando a coloração ficava fraca, procedia-se um banho de TAE contendo BrEt (1mg/ml) no gel por 20 min.

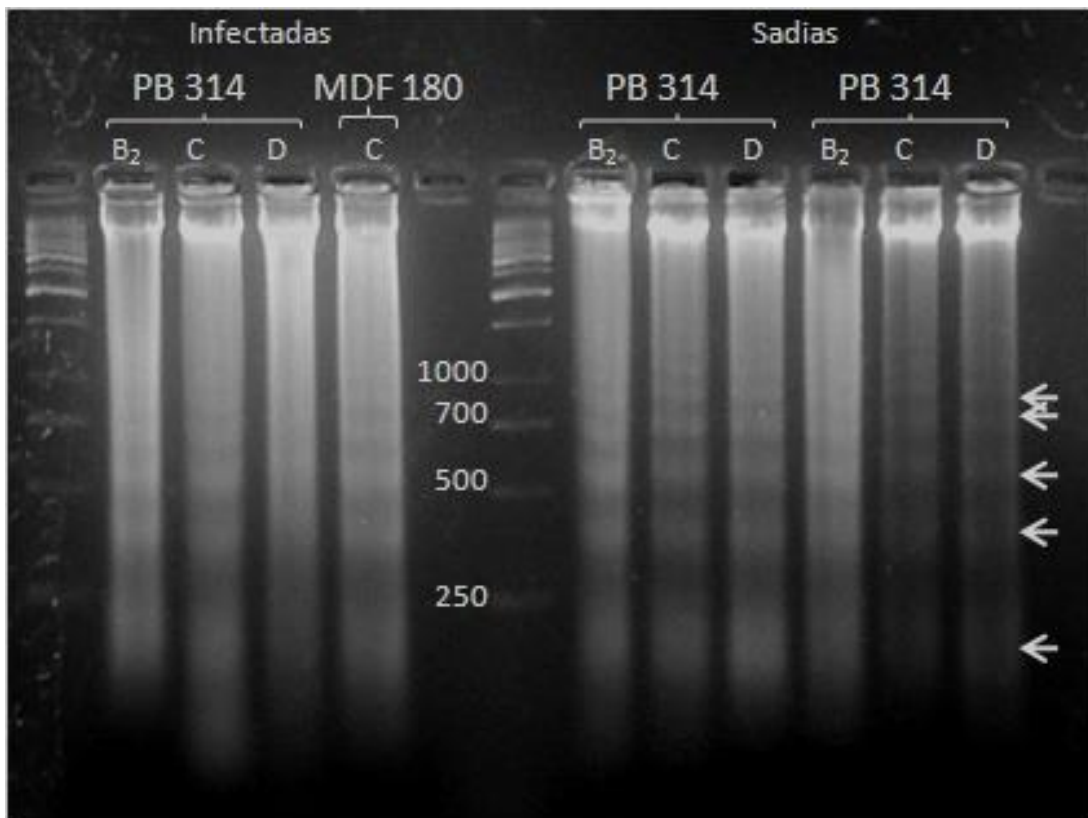


Figura 16. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% de amostras infectadas e sadias de PB314 e MDF180, tratadas com RNase. Todas as amostras exibem o mesmo padrão de bandas (setas). Corrida: três horas a 75V.

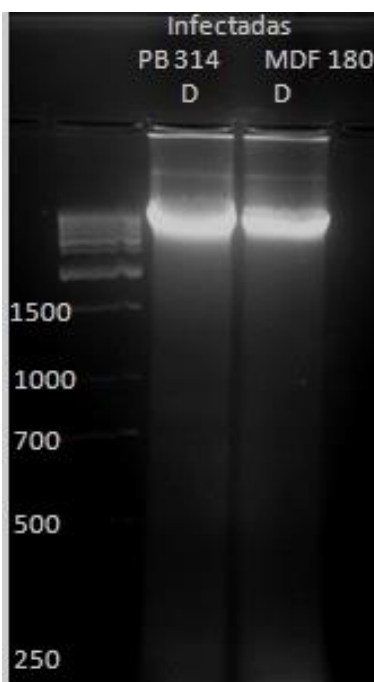


Figura 17. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% de amostras infectadas de PB314 e MDF180. As amostras não foram tratadas com RNase não exibem nenhuma banda. Corrida: três horas a 75V seguido por um banho no TAE com BrEt (1mg/ml).

A Figura 18 representa a análise das amostras de DNA isoladas de lesões e de folhas sadias em diferentes estágios de desenvolvimento foliar, coletadas em campo, dos genótipos PB314 e MDF180. O clone FX2784 não foi testado devido à ausência de sintomas nas folhas.

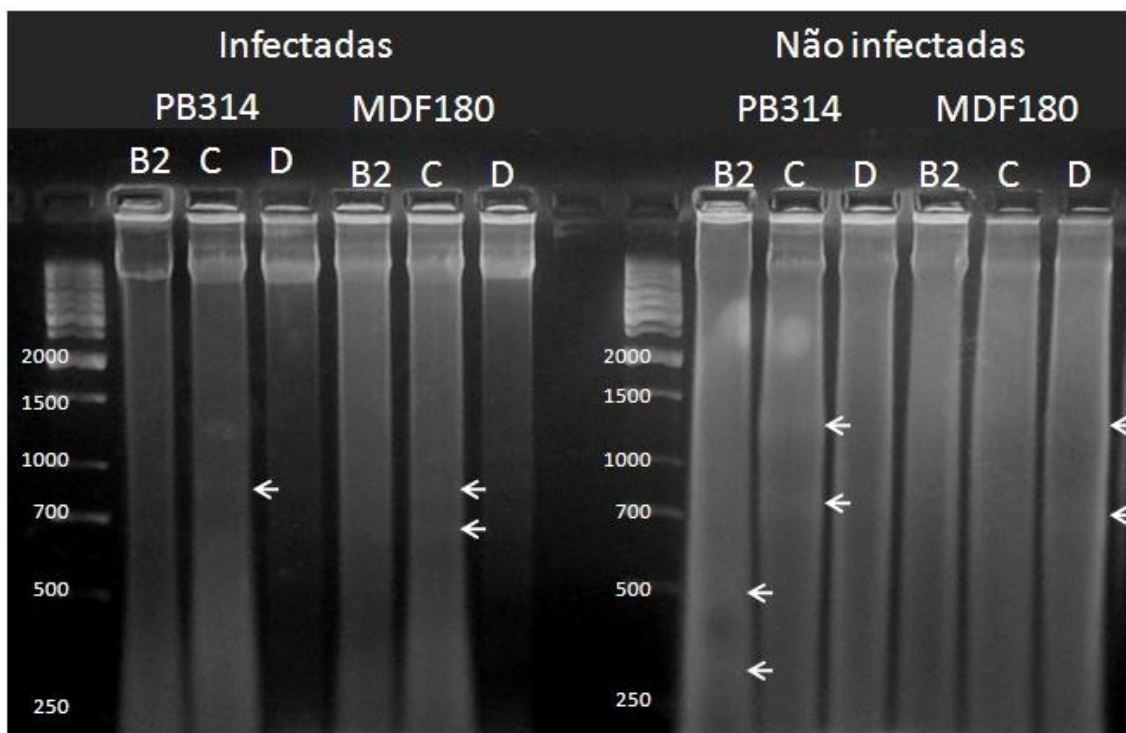


Figura 18. Eletroforese de DNA em gel de agarose 2% de amostras infectadas e não infectadas de PB314 e MDF180. As amostras não foram tratadas com RNase. Discretas bandas (setas) podem ser observadas nas amostras infectadas de DNA de PB314 e MDF180 no estágio C. Nas amostras não infectadas observa-se bandas em PB314, estágios B₂ e C, e em MDF180, estágio D. Corrida: três horas a 75V seguido por um banho no TAE com BrEt (1mg/ml).

Esta técnica não permitiu uma análise mais acurada do processo de fragmentação do DNA devido a sua baixa sensibilidade.

4.4 Detecção e quantificação de células com núcleos TUNEL-positivos

Para a detecção de fragmentação do DNA através da técnica de TUNEL foi necessário a otimização do protocolo para seringueira. As principais dificuldades foram referentes à preservação e à aderência dos cortes na lâmina durante todo o processamento.

Nas primeiras lâminas montadas, as secções transversais de folha de seringueira foram fixadas em adesivo de Bissing. Ao final do processamento, todos ou quase todos os cortes eram perdidos. Os poucos que ficavam aderidos na lâminas apresentaram-se bastante degradados (Figura 19A – C). A segunda alternativa foi a utilização de poly-L lysine (Sigma). Porém não houve uma melhora na adesão dos cortes (Figura 19D e E).

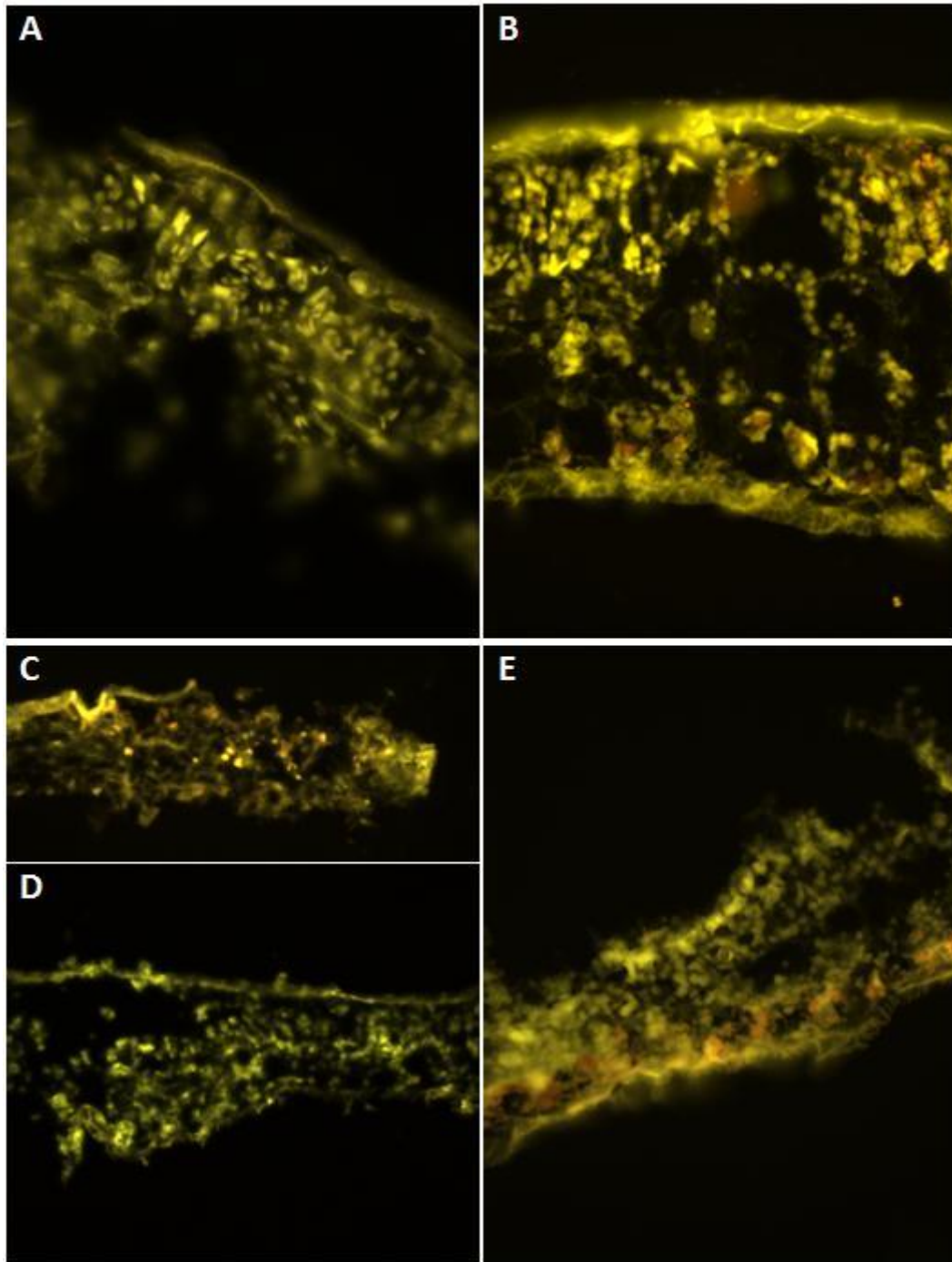


Figura 19. Secções transversais de folhas de seringueira, fixadas com adesivo de Bissing (A – C) e *poly-L-lysine* (D e E) Observa-se a perda de material em decorrência da pouca aderência dos cortes com o uso destes adesivos. Secções transversais de folhas infecadas de FX2784, 96 hai (A), MDF180, 168 hai (B e D), PB314, 168 hai (C e E).

A alternativa utilizada até o momento foi a albumina glicerinada (albumina: glicerina, 1:1), utilizada anteriormente em análises de TUNEL em jenipapo (SOUZA, 2007). Uma comparação entre os três adesivos (Tabela 4) permitiu identificar que a albumina proporciona melhor adesão dos cortes às lâminas, embora apresente algumas limitações na aderência de folhas de seringueira. Esta é uma etapa que ainda precisa ser otimizada.

Tabela 4. Eficiência dos adesivos histológicos baseado na relação cortes aderidos x cortes perdidos

	% corte aderidos*	% cortes perdidos**
Adesivo de Bissing	30%	70%
Poly-L-lysine	20%	80%
Adesivo de Haupt	70%	30%

* Foram analisadas 12 lâminas, contendo 16 cortes de folha de seringueira cada uma.

** Foram considerados perdidos os cortes que apresentaram pelo menos 1/3 das células degradadas.

As folhas infectadas pelo patógeno e sondadas com TUNEL estão representadas nas Figuras 20, 21 e 22.

As Figuras 20A – C representam secções transversais de folhas infectadas e não infectadas do clone PB314, coletadas 168 hai. A Figura 20A, correspondente ao controle positivo (secções de folhas não infectadas tratadas com DNase para induzir quebras no DNA), apresenta vários núcleos com reação TUNEL-positivos. As Figuras 20B e C representam secções de folhas infectadas pelo fungo *M. ulei*. Nota-se a presença de núcleos fluorescentes, característicos de apoptose devido à fragmentação do DNA, enquanto que nas secções de folhas sadias (Figura 20D) não observa-se nenhuma fluorescência.

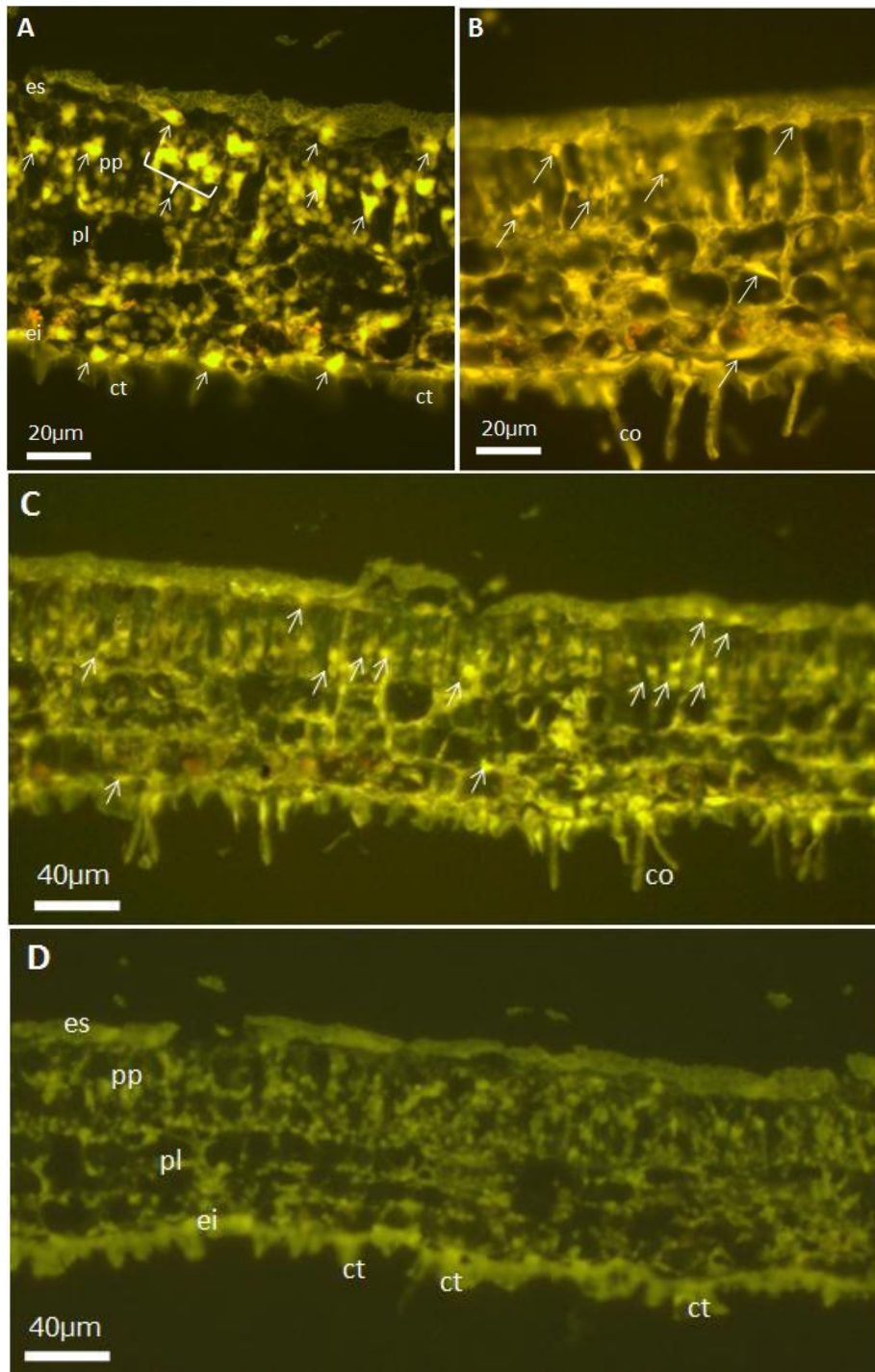


Figura 20. Secções transversais de folhas de seringueira do PB314, sondadas com TUNEL. A: Controle positivo, folhas saudáveis tratadas com DNase. Observa-se a presença de vários núcleos TUNEL-positivos (setas). B e C – Secções transversais de uma lesão, 168 hpi. Observa-se a presença de conídios (co) e núcleos fluorescentes (setas). D: Secção transversal de tecido foliar saudável, sem nenhuma fluorescência. Legenda – es: epiderme superior; pp: parênquima paliádico; pl: parênquima lacunoso; ei: epiderme inferior; ct: cutícula.

As Figuras 21A – C representam secções transversais de folhas infectadas e não infectadas do clone MDF180, coletadas 168 hai. A Figura 21A, corresponde ao controle positivo (secções de folhas não infectadas tratadas com DNase). Observa-se a presença de núcleos TUNEL-positivos. A Figura 21B representa secções de folhas infectadas pelo fungo *M. ulei*. Não foi observada nenhuma fluorescência tanto nos tecidos infectados pelo patógeno quanto nos tecidos saudios (Figura 21C).

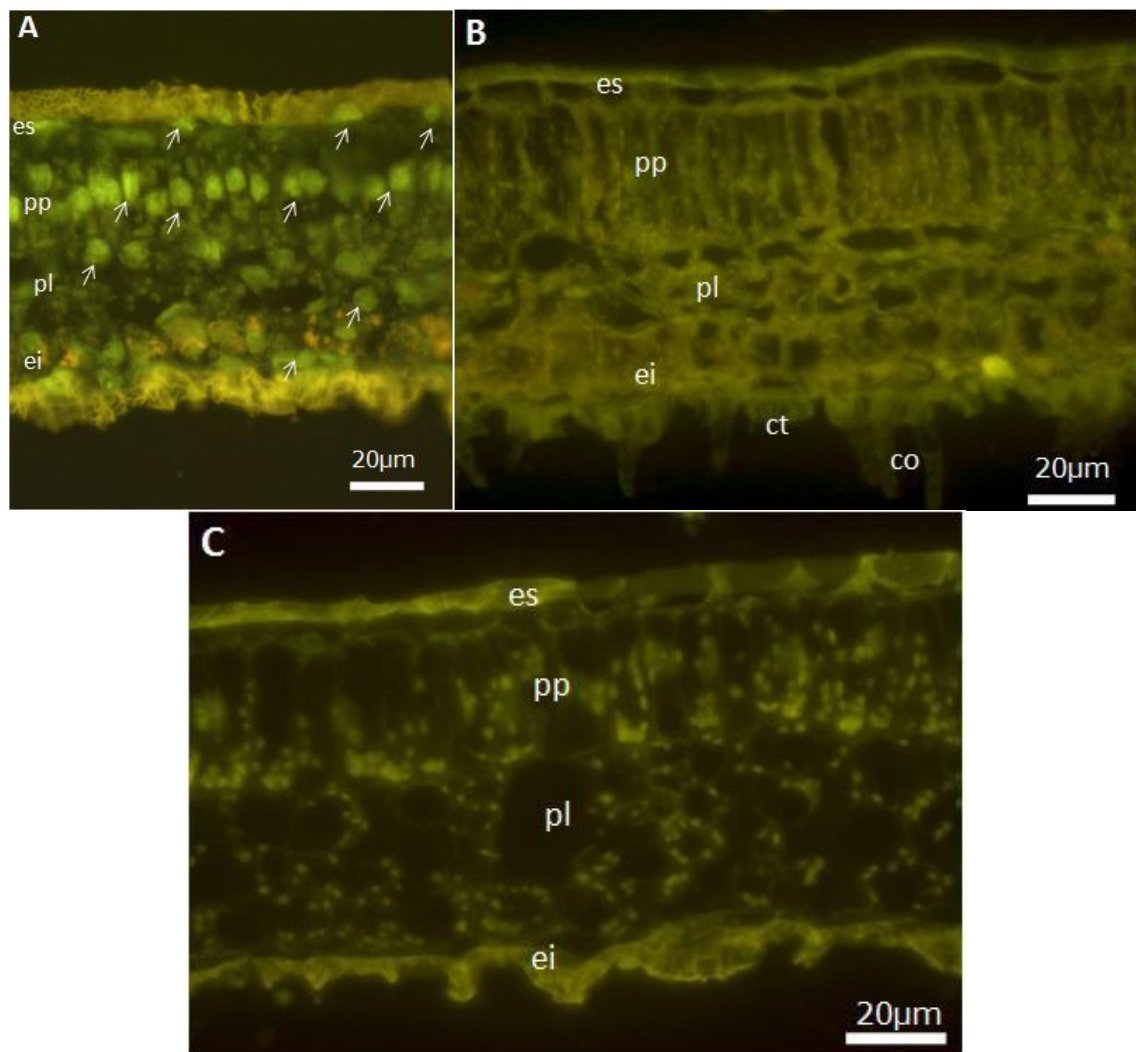


Figura 21. Secções transversais de folhas de seringueira do MDF180, sondadas com TUNEL. A: Controle positivo, folhas saudias tratadas com DNase. Observa-se praticamente todos os núcleos fluorescentes (setas). B – Secção transversal de uma lesão, 168 hai. Observa-se a presença de conídios (co), mas nenhum núcleo TUNEL-positivo. C: Secção transversal de tecido foliar sadio, sem nenhuma fluorescência.

O clone FX2784 foi testado para um tempo de coleta inferior, 96 hai, devido à presença de HR, que é um evento precoce. Porém, nesta etapa as análises ficam limitadas, pois a infecção apresenta um período de latência, sem o aparecimento de sintomas, principalmente em FX2784.

As Figuras 22A – C representam secções transversais de folhas infectadas e não infectada do clone FX2784, coletadas 96 hai. A Figura 22A, corresponde ao controle positivo (secções de folhas não infectadas tratadas com DNase). Observa-se a presença de núcleos TUNEL-positivos. Na Figura 22B, secção transversal de folha infectada por *M. ulei*, observa-se pouco núcleos com uma fluorescência baixa, indicando células apoptóticas mas que podem não ser provenientes de uma HR por apresentarem-se dispersas pelo mesófilo foliar e pela ausência de conídios nas secções analisadas. No tecido sadio não foi observada nenhuma fluorescência (Figura 22C).

A ocorrência de núcleos TUNEL-positivos nos três genótipos, PB314, MDF180 e FX2784, está quantificada na Tabela 5.

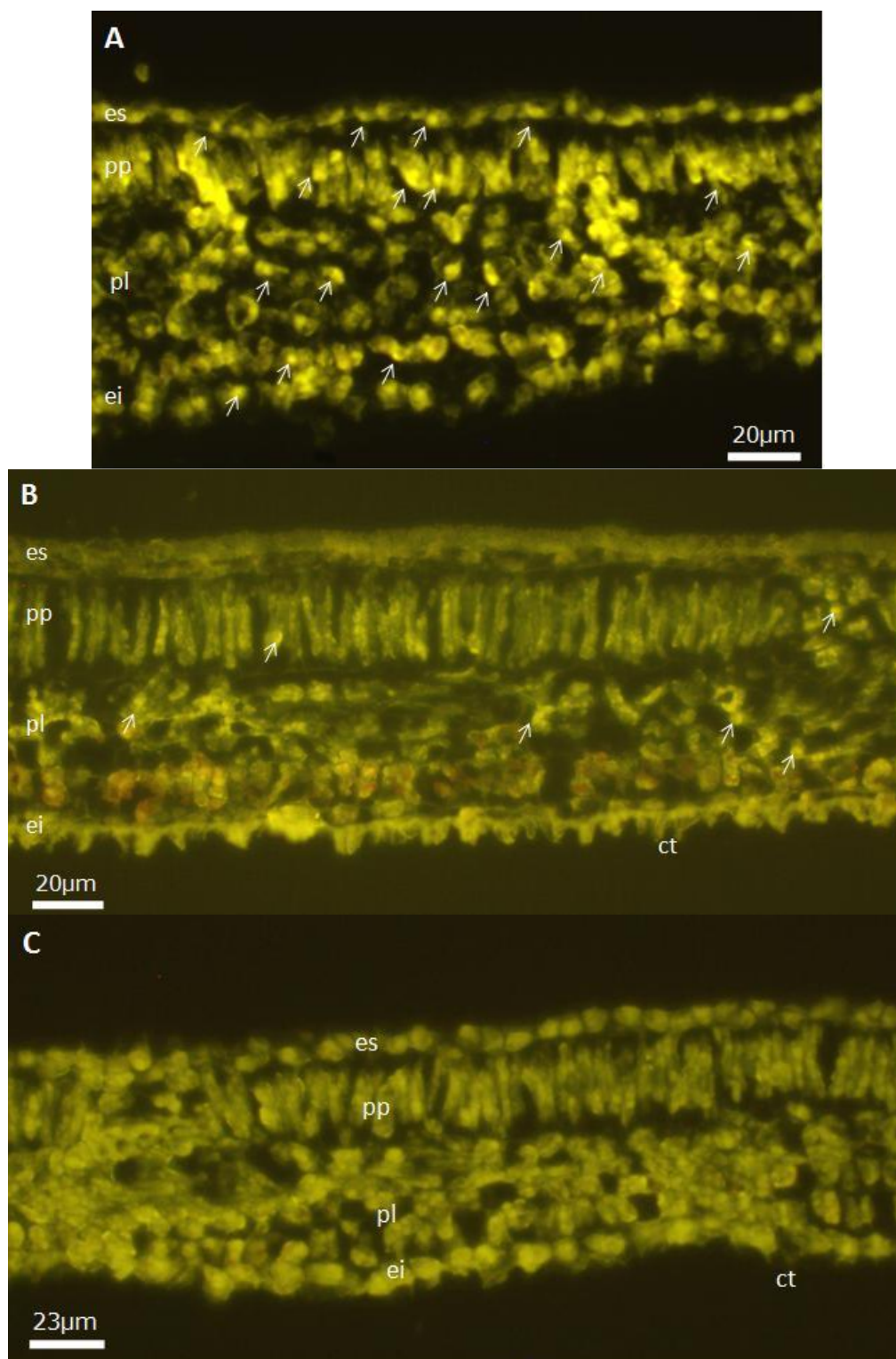


Figura 22. Secções transversais de folhas de seringueira do FX2784, sondadas com TUNEL. A: Controle positivo, folhas saudáveis tratadas com DNase. Verifica-se a presença de núcleos TUNEL-positivos (setas). B – Secção transversal folha infectada, 96 hai. Não observa-se a presença de conídios, mas apresenta discreta fluorescência em alguns núcleos. C: Secção transversal de tecido foliar sadio, sem nenhuma fluorescência.

Tabela 5. Quantificação dos núcleos TUNEL-positivos em PB314, MDF180 e FX2784.

Genótipos (coleta)	% núcleos TUNEL-positivos x tratamento		
	Controle positivo (DNase)	Infectadas	Sadias
PB314 (168 hai)	57%	35%	--
MDF180 (168 hai)	98%	--	--
FX2784 (96 hai)	51%	0.3%	--

-- Nenhuma fluorescência foi detectada no tecido foliar

4.5 Análises do perfil de expressão gênica de genes relacionados a estresse e defesa

Os estudos de expressão gênica via macroarranjos permitem avaliação global das vias de sinalização e das vias metabólicas reguladas ao longo do processo infeccioso.

As análises do perfil de expressão de genes de estresse e defesa, a partir dos dados de macroarranjos de cDNA (comunicados por D. Garcia), permitiram a identificação de genes deste grupo funcional com maior nível de expressão no clone MDF180 em relação a expressão do clone suscetível PB314.

A Figura 23 traz um agrupamento hierárquico do perfil de expressão gênica temporal de 311 genes significativamente expressos em pelo menos um estágio de desenvolvimento das lesões foliares em MDF180 e PB314. A Tabela 6 apresenta unicamente os genes de estresse e defesa que foram identificados como diferencialmente expressos entre MDF180 e PB314 ao longo do processo infeccioso. As prováveis funções desses genes estão associadas a genes R (NBS-LRR, Cf5), à via de síntese das ligninas (*cinnamoyl CoA reductase*, *enolase*, *alcohol dehydrogenase*, *peroxidase*), a inibidores de

proteases (cistatina), a proteínas relacionada a patogênese (PR) e à detoxificação celular de espécies reativas de oxigênio, EROs, (*thioredoxine dependent peroxidase*). Estas enzimas regulam o nível EROs nas células e nos tecidos e os protege contra danos oxidativos. Aumentos da expressão mais tardios são observados no clone PB314 para os genes LRR *disease resistant*, proteínas PR, quitinase, MnSOD, peroxidase, enolase e inibidor de protease.

É interessante observar as variações de alguns genes envolvidos no estresse oxidativo apesar da razão (M) variar entre -2 e 2 (Fig. 24). Assim, pode-se notar uma redução das atividades MnSOD e catalase no clone PB314, enquanto se observa um aumento de uma MnSOD provavelmente oriunda do fungo (homologia com MnSOD de *Antrodia camphorata*) (Fig. 24A). Vários genes envolvidos na detoxificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apresentam uma maior indução em lesões novas do clone MDF180 seguido por aumento relativo no clone PB314 (Fig. 24B). Se observa também variações para alguns genes relacionados com produção de moléculas antioxidantes (ascorbato, glutatona) (Fig. 24C). Uma maior indução aparece para a glutatona-S-transferase e ascorbato peroxidase em lesões novas de MDF180 prosseguindo por um nível de expressão comparável entre os genótipos. Enquanto a *monodehydroascorbate reductase* é mais expressas em lesões do clone PB314 em lesões novas e tende a aumentar no MDF180 em lesões mais velhas. Genes como Bax inibidor e *defender against cell death like molecule* não apresentam variações significativas entre os genótipos MDF180 e PB314, apesar do Bax inibidor ter sido identificado na biblioteca SSH do MDF180, 4 – 28 dai (Andrade, 2008) (Fig. 24D).

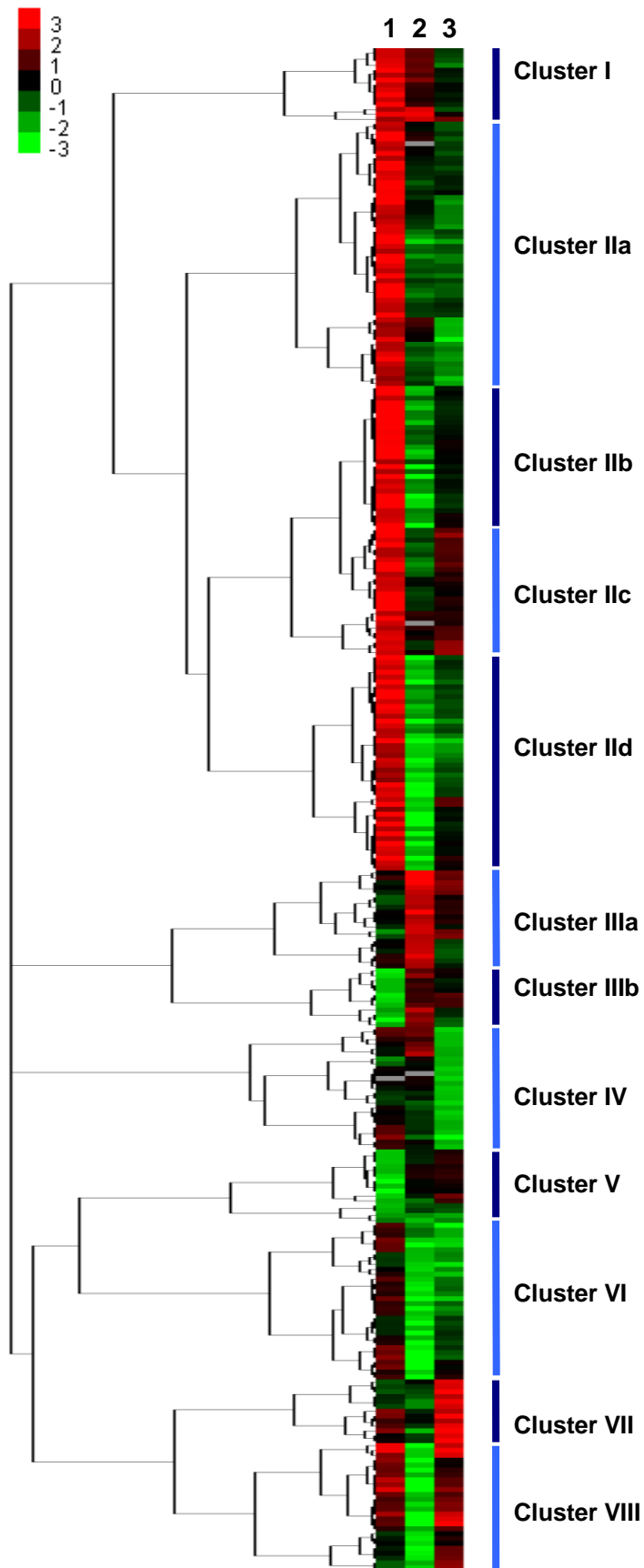


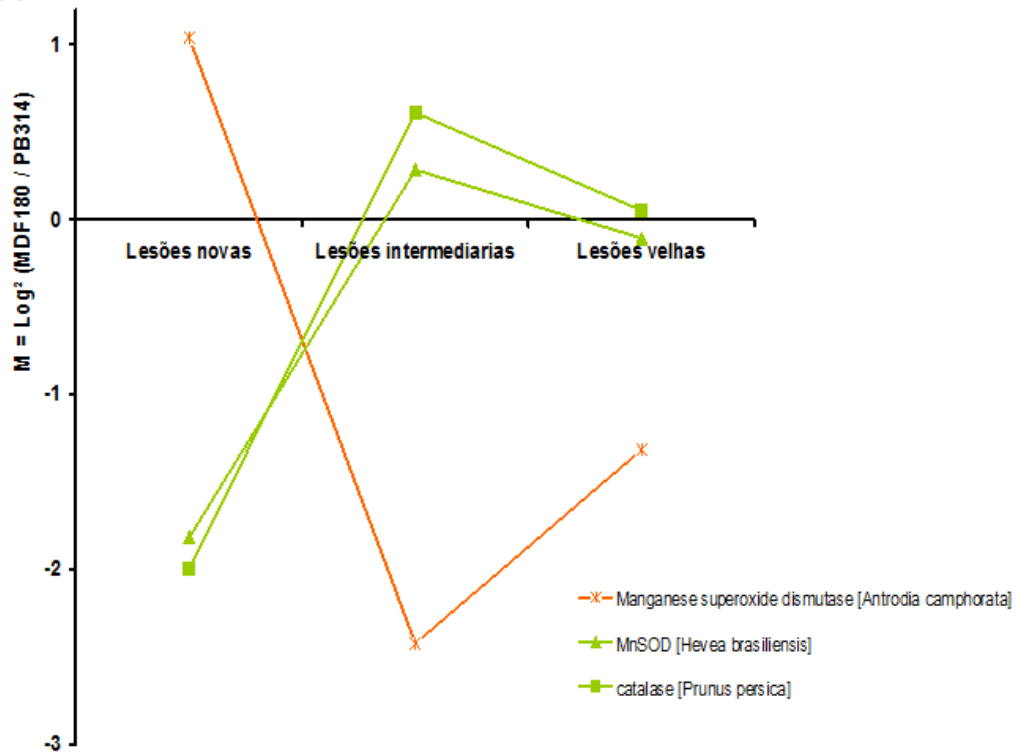
Figura 23. Agrupamento hierárquico mostrando o perfil de expressão gênica temporal nos clones MDF180 e PB314 com 311 genes apresentando um nível de expressão relativo significativamente diferente pelo menos em um estágio de desenvolvimento das lesões (1 – lesões novas, 2 – lesões intermediárias e 3 – lesões velhas). A cor vermelha indica aumento da expressão no clone MDF180, a cor verde indica aumento de expressão no clone PB314 e a cor preta nenhuma mudança no nível dos transcritos entre os dois clones. (Resultados de arranjos comunicados por D. Garcia).

Tabela 6. Genes de defesa e estresse significativamente expressos pelo menos em um estágio de desenvolvimento das lesões foliares nos genótipos MDF180 ($M \geq 2$) e/ou PB314 ($M \leq -2$). (Resultados de arranjos comunicados por D. Garcia).

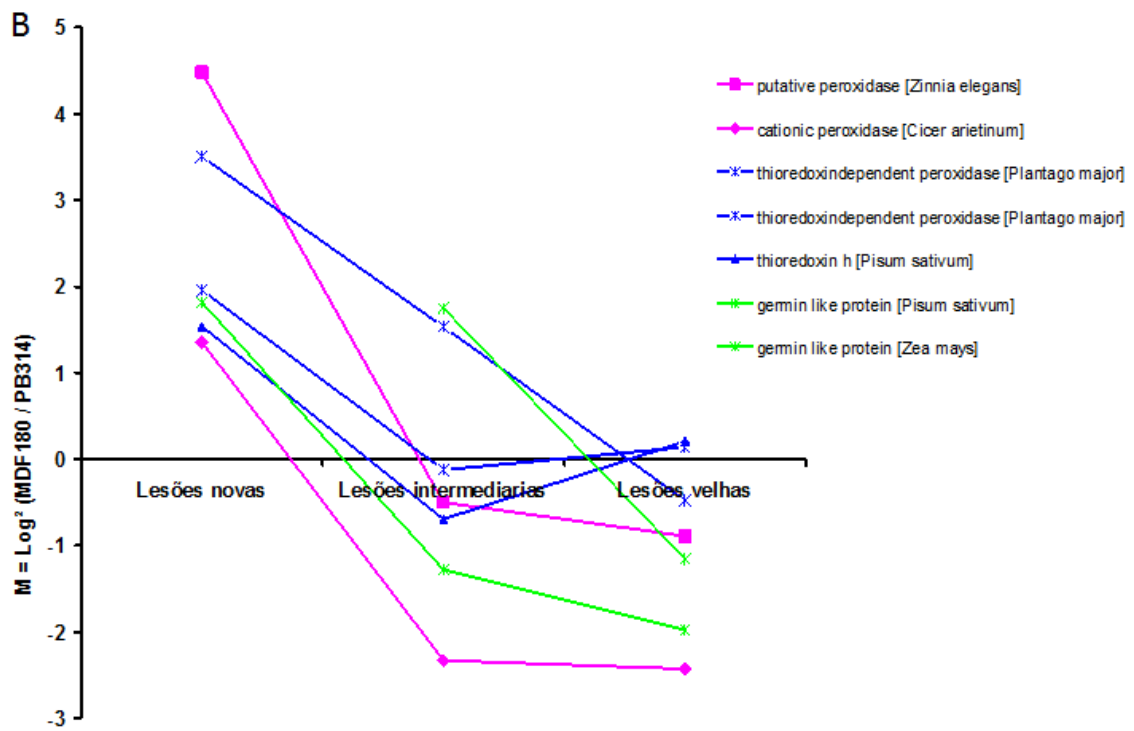
Referência	Sequência provável	LN	LI	LV	GP
Q9FQF3.1	Glutathione S transferase GST 5 [<i>Glycine max</i>]	2.64	0.51	-0.11	I
emb CAH58634.1	Thioredoxindependent peroxidase [<i>Plantago major</i>]	3.50	1.53	-0.48	I
emb CAA11899.1	Cystatin [<i>Castanea sativa</i>]	2.03	2.63	-0.93	I
610 GO	Putative NBS-LRR disease resistance protein	3.93	0.34	-0.60	IIa
emb CAH69536.1	Putative peroxidase [<i>Zinnia elegans</i>]	4.48	-0.50	-0.89	IIa
emb CAH57490.1	Alcohol dehydrogenase [<i>Populus tremula</i>]	2.07	-0.67	-1.54	IIa
emb CAB64227.1	Disease resistance like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3.79	-1.19	-0.08	IIb
gb AAT39306.1	Putative cinnamoylCoA reductase [<i>Solanum demissum</i>]	3.04	-1.19	-0.22	IIb
gb AAS18240.1	Enolase [<i>Glycine max</i>]	2.06	0.53	0.86	IIc
Q9C911.1	Putative heat shock protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3.25	-0.62	0.47	IIc
dbj BAD94317.1	Cf5 disease resistance protein like [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	3.29	-0.48	0.40	IIc
gb AAV28626.1	Bet v I allergen [<i>Zea mays</i>]	-1.75	2.47	1.27	IIIa
emb CAF33484.1	Putative pathogenesis related protein [<i>Cucumis sativus</i>]	0.06	2.31	-0.87	IIIa
gb AAQ07267.1	Acidic chitinase [<i>Ficus awkeotsang</i>]	-0.24	0.06	-2.37	IV
gb AAR12195.1	Molecular chaperone Hsp901 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	-1.42	-2.26	-1.53	V
Q7Z8K5.1	Manganese superoxide dismutase [<i>Antrodia camphorata</i>]	1.04	-2.42	-1.31	VI
emb CAB71128.2	Cationic peroxidase [<i>Cicer arietinum</i>]	1.35	-2.33	-2.43	VI
emb CAB96173.1	Enolase [<i>Spinacia oleracea</i>]	0.19	-0.59	3.11	VII
Q6XNP7.1	Protease inhibitor protein 1 [<i>Hevea brasiliensis</i>]	-0.27	-2.83	0.45	VIII
Q8LDD9.1	Putative leucine rich repeat disease resistance protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	1.82	-3.34	1.04	VIII

* LN= lesões novas; LI= lesões intermediária; LV= lesões velhas; GP= grupo

A



B



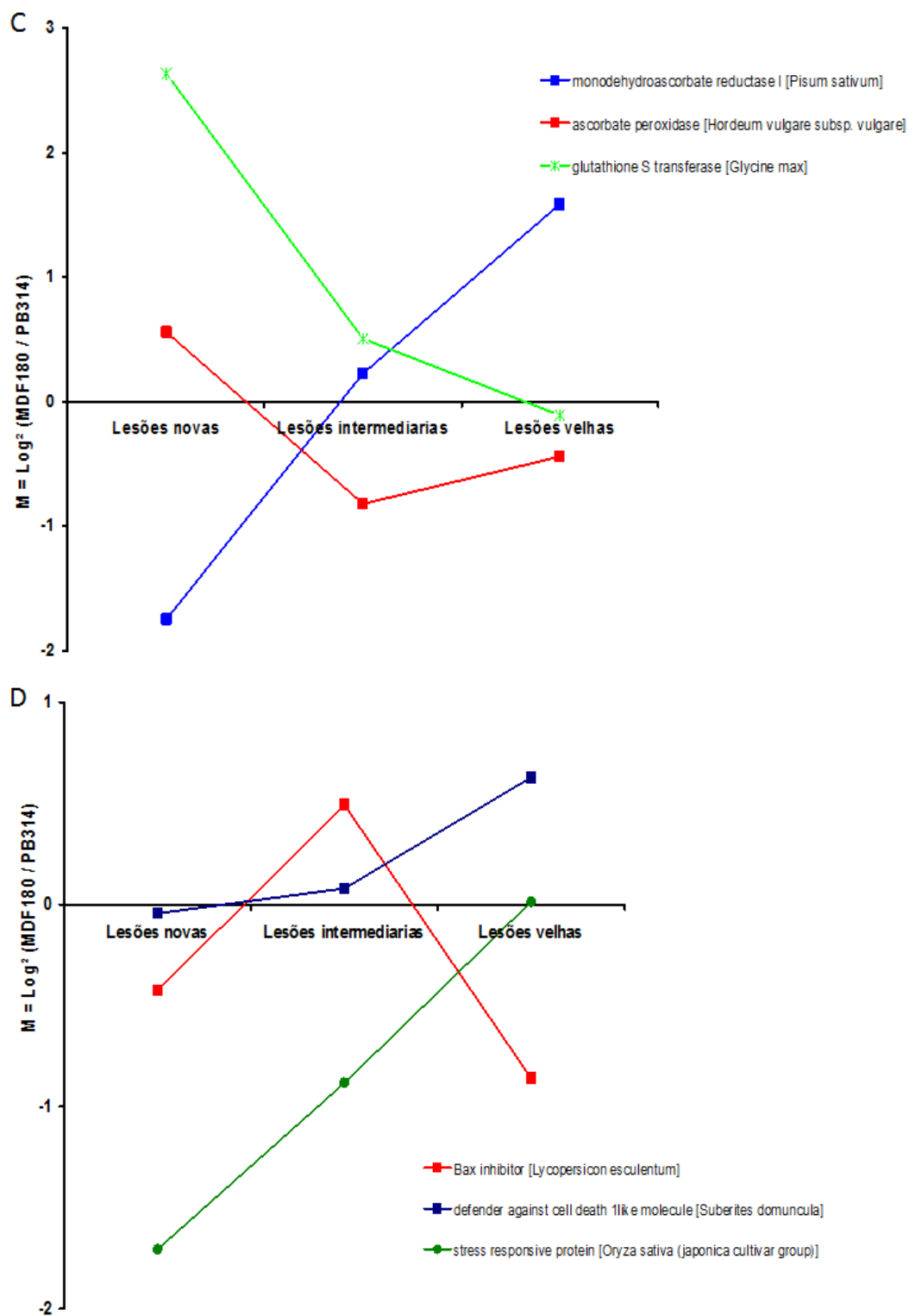


Figura 24. Nível de expressão relativo (MDF180 vs. PB314) de genes envolvidos no estresse oxidativo em lesões novas, intermediárias e velhas coletadas em folhas de *Hevea brasiliensis* dos genótipos MDF180 e PB314. (Resultados de arranjos comunicados por D. Garcia).

5 DISCUSSÃO

Até hoje, os estudos histológicos desenvolvidos com clones resistentes e suscetíveis ao Mal-das-folhas (HASHIM, 1978; GARCIA et al., 1995a, 1995b; SAMBUGARO et al., 2004) tiveram como objetivo principal observar as reações tissulares. Porém, nenhum desses estudos conseguiu demonstrar a localização intercelular do *M. ulmi* ao longo do processo infeccioso. Neste estudo, a técnica de dupla coloração PAS + *Naphthol Blue Black*, permitiu visualizar pela primeira vez de forma nítida a localização intercelular do micélio até 240 hpi. Essas observações confortam a hipótese de um modo de vida biotrófico do *M. ulmi*, sendo que a maioria dos fungos necrotróficos ou hemibiotróficos acabam apresentando uma localização intracelular (Figuras 15C) em alguma fase da infecção (BENTES; MATSUOKA, 2004; CEITA et al., 2007; FREITAS; MENDES, 2005).

Sendo um fungo biotrófico, as reações de PCD deveriam ocorrer preferencialmente na fase precoce da infecção (associada a HR). Reações de colapsos celulares dos tecidos epidérmicos e sub-epidérmicos já foram relatados por Hashim (1968) em folíolos destacados de plantas e infectados com gotículas de inóculo, nos clones resistentes HHB14, IAN2829, F351, F10 3/5, 64B837, 62C226 de 24 até 96 hpi. No máximo, cinco células em cada ponto de penetração são afetadas explicando as dificuldades encontradas em nosso trabalho para realizar cortes passando por estes pontos de penetração nos tempos curtos após infecção. Além disso, para folhas infectadas *in planta*, o número de pontos de penetração é reduzido drasticamente por causa do escorregamento das gotículas. Apesar de ter testado outros métodos de inoculação (infecção de folíolos sobreviventes em placa de Petri com pincel coberto de inóculo) preferimos infectar as folhas com atomizador para evitar todos as reações secundárias que podem ocorrer em folhas destacadas da

planta e coletar o material a partir do aparecimento dos sintomas. Para os futuros trabalhos, estas dificuldades metodológicas deverão ser resolvidas aumentando a concentração do inóculo (porém evitando altas concentrações que induzem abscisão foliar) e utilizando outras técnicas de observação, como a microscopia confocal. As reações de apoptose poderão ser procuradas em genótipos como FX2784 apresentando resistência total para alguns isolados de *M. ulei*.

De acordo com os resultados de Sambugaro (2004), a colonização do fungo ocorre de maneira semelhante em ambos os genótipos. Porém, com a evolução da doença os genótipos se comportam de maneira completamente distinta, evidenciando fortemente os fenótipos de suscetibilidade (PB314) e resistência parcial (MDF180). Os tecidos foliares de PB314, 168 hai, apresentam-se completamente degradados (Figura 13B), ao contrário do observado em MDF180 (Figura 14B), que mantém os seus tecidos íntegros. A integridade dos tecidos foliares do MDF180 e a resistência parcial deste clone MDF180 pode estar relacionada às barreiras estruturais da folha de seringueira, como lignificação, e/ou aos compostos bioquímicos produzidos durante a infecção, como fenóis e escopoletina (GARCIA et al., 1995c; SAMBUGARO et al., 2003).

No clone PB314, células com características apoptóticas (Figura 13D, F e G) foram observadas como condensação e desestruturação do núcleo, vacuolização e granulação do citoplasma. Porém, o número reduzido destas células pode ter inviabilizado a detecção do ladder através da eletroforese em gel de agarose, demonstrando que a técnica apresenta limitações por ser pouco sensível. A complementação das observações histológica com o teste TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP Nick end-labelling), para detectar fragmentação dos DNA em tecidos infectados, confirmou no clone PB314, 168 hai, a presença de núcleos TUNEL-positivos (Figura 20B e C).

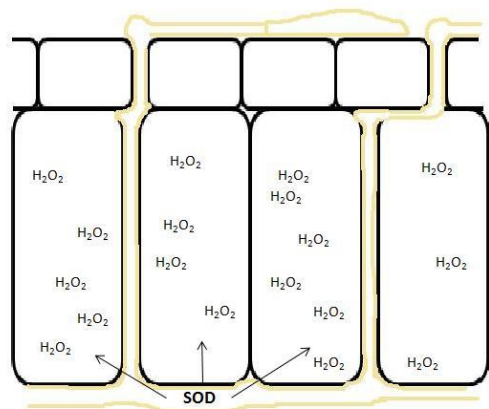
Em FX2784, foram observados alguns núcleos com baixa fluorescência (Figura 22B), podendo indicar fragmentação do DNA e apoptose. Porém, a

localização dispersa desses núcleos e a ausência de conídios não permitiu relacionar a PCD com uma HR, que é uma resposta localizada de morte celular, como demonstrado por Greenberg e Yao (2004). Nas interações entre aveia-*Puccinia coronata* e *Arabidopsis-P. syringae*, observou-se que células adjacentes à primeira célula que morre têm características apoptóticas como condensação da cromatina e clivagem endonucleotídica (GREENBERG; YAO, 2004).

Nos tecidos foliares infectados do clone MDF180, não foram detectadas células em fase de apoptose, indicando que a resistência parcial observada neste clone não estaria relacionada por uma sinalização via morte celular. Os dados de expressão gênica indicam, no clone MDF180, um aumento da expressão de genes relacionados com detoxificação das EROs como *thioredoxine dependent peroxidase*, peroxidase (envolvida na síntese das ligninas), *germin like protein* (CHRISTENSEN et al., 2004), protegendo contra os danos oxidativos e, conseqüentemente, assegurando a preservação das membranas celulares e reduzindo os vazamentos de eletrólitos citoplasmáticos. No clone PB314, essas enzimas aparecem mais induzidas em lesões intermediárias ou velhas. Essa latência seria prejudicial à integridade dos tecidos, suportado pelo fato que o fungo *M. ulei*, poderia ter uma MnSOD (homologia encontrada com MnSOD de *Antrodia camphorata*) cuja a expressão é crescente em lesões intermediárias do clone PB314 e pode estar relacionada com a propagação do micélio nos tecidos. Esse aumento da atividade MnSOD fúngica teria como consequência uma elevação de H₂O₂, não detoxificado nos genótipos suscetíveis, o que seria responsável de um aumento dos danos tissulares (Figura 25 e 26). Segundo Cessna et al. (2000), altas concentrações de EROs são tóxicas, expondo as células a danos nas membranas e no DNA.

Em relação aos genes *Bax inhibitor* e *defender against cell death*, os níveis de expressão foram comparáveis entre os dois genótipos. Para confirmar esses resultados, análises de expressão via RT-qPCR deverão ser desenvolvidos.

PB314 – 168 hai



PB314 – 168 hai

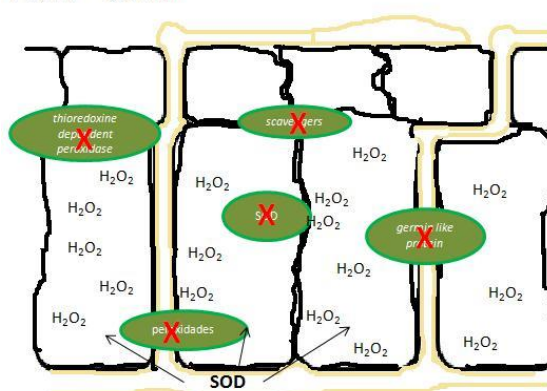
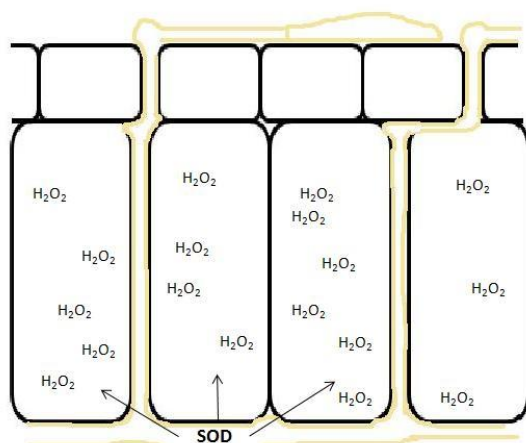


Figura 25. Explosão oxidativa em PB314. A expressão tardia de genes de detoxificação de EROs não protege as células contra danos oxidativos, levando a degeneração dos tecidos

MDF180 – 168 hai



MDF180 – 168 hai

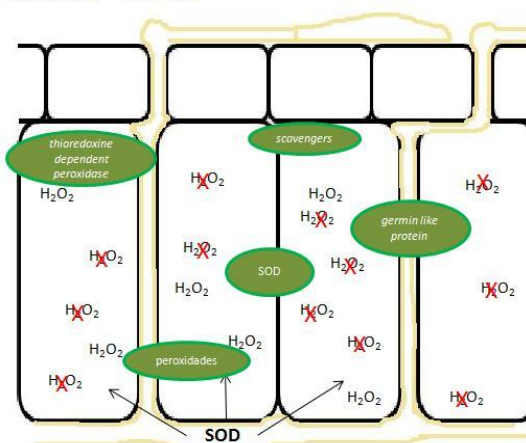


Figura 26. Produção de H_2O_2 após ataque do patógeno. Superexpressão de genes detoxificadores de EROs, nas lesões novas, diminuem o nível de H_2O_2 , protegendo as células contra danos oxidativos e degeneração dos tecidos.

A análise do conjunto dos genes associados com estresse e defesa, mostra também a indução, em lesões novas do clone MDF180, de R-genes com função atribuída ao reconhecimento e disparo dos mecanismos de defesa (VAN LOON et al., 2006; WANG et al., 2001): *NBS-LRR disease resistance protein* e *Cf5 disease resistance protein like*. Proteínas contendo domínios NBS-LRR estão envolvidas em uma série de mecanismos de defesa nas

plantas, como a ativação da explosão oxidativa, o fluxo de íons de cálcio e as cascatas de proteínas quinases associadas à indução de genes relacionados à patogênese e repostas de hipersensibilidade (VAN DER BIEZEN; JONES, 1998; PEYYALA; FARMAN, 2006). Essas proteínas conferem resistência a uma ampla gama de patógenos, incluindo bactérias, fungos, viroses e nematóides (WANG et al., 1999).

Entre os mecanismo de defesa, a via de síntese de lignina aparece ativadas no MDF180, observado através do aumento do número de transcrito da *cinnamoyl CoA reductase*, *alcohol dehydrogenase* e peroxidase. Os genes *cinnamoyl CoA reductase* e *alcohol dehydrogenase*, são dois genes-chave no processo de lignificação. O primeiro está envolvido na regulação do fluxo de carbono na lignina e o segundo cataliza o último passo dos monolignóis, reduzindo os cinamaldeídos em álcool cinamil (BAUCHER et al., 2003). Esses dados corroboram resultados anteriores de Garcia et al. (1995c) e Sambugaro et al. (2004), mostrando o acúmulo de lignina em genótipos com resistência parcial. A lignina tem um papel importante como barreira estrutural ao *M. ulei*, impedindo a propagação do micélio e protegendo a parede vegetal de hidrolases do fungo e limitar as trocas de água e nutrientes entre hospedeiro e parasita.

No clone MDF180, inibidor de cisteíno protease (cistatina) aparece mais expresso tanto em lesões novas como intermediárias, podendo inibir a PCD neste clone. Segundo Solomon et al (1999), as cisteíno-proteases têm sido consideradas enzimas chaves na regulação da PCD. Em soja, a ativação de uma ou mais protease induziu a morte celular. Em contrapartida, a expressão de cistatina, inibe a atividade da cisteíno-protease e bloqueia a PCD ou causada pelo patógeno ou por estresse oxidativo.

Não se pode afirmar que a atividade de determinadas proteases são parte do sistema de sinalização de morte celular ou do processo de autólise. Entretanto, inibidores de cisteíno proteases podem bloquear a diferenciação de TE em cultura, sugerindo um papel na sinalização da morte (FUKUDA, 1997).

6. CONCLUSÕES

- As análises histológicas das reações tissulares dos três genótipos, possibilitaram a comparação da evolução da doença entre os diferentes níveis de resistência: suscetível (PB314); parcialmente resistentes (MDF180 e FX2784). O FX2784 considerado, inicialmente, resistente demonstrou que essa resistência pode ser facilmente quebrada dependendo da agressividade da cepa.
- A integridade dos tecidos e a ausência de MDF180, 168 hai, parece estar relacionada com o alto nível de expressão, no início da infecção, de genes relacionados com a síntese de lignina, detoxificação celular de EROs, genes R, PR e inibidores de protease.
- A degradação dos tecidos e a ocorrência de PCD em PB314, 168 hai, pode estar relacionada com a supressão de genes de resistência e proteção celular nas etapas iniciais da infecção.
- A detecção de núcleos TUNEL-positivos em FX2784, 96 hai, pode não estar relacionada a HR, considerando a localização dos núcleos fluorescentes e a ausência de conídios.
- A eletroforese em gel de agarose mostrou-se pouco sensível em detectar a fragmentação do DNA, verificada nos genótipos PB314 e FX2784 através da técnica de TUNEL.
- A técnica de macroarranjo não verificou expressão diferenciada em genes relacionados com PCD entre PB314 e MDF180, identificados apenas na biblioteca SSH do MDF180.

7 REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, R.; KIM, Y.; CHEN, S.; DICKMAN, M.; MARTIN, G.
Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. **EMBO J**, v. 22: p. 60–69, 2003.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- ANDRADE, S.J. **Análise de genes diferencialmente expressos na interação *Hevea brasiliensis* – *Microcyclus ulei***. 2008. 74p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.
- AKAMATSU, H.; ITOH, Y.; KODAMA, M.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology**, v. 87, p. 967–972, 1997.
- BAUCHER, M.; CHABBERT B.; PILATE G.; VAN DOORSSELAERE J.; TOLLIER M.T.; PETIT-CONIL M.; MONTIES B.; VAN MONTAGU M.; INZÉ D.; JOUANIN L.; BOERJAN W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. **Plant Physiology**, v. 112, p.1479–1490, 1996.
- BEERS, E.P.; MCDOWELL, J.M. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p.561-567, 2001.
- BENT, A.F. Plant disease resistance genes: function meets structure. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1757-1771, 1996.
- BENTES, J.L.S; MATSUORA, K. Histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 224-231, 2004.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1996. 289p.

BESSE, P.; SEGUIN, M.; LEBRUN, P.; CHEVALLIER, M.H.; NICOLAS, D.; LANAUD, C. Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetic**, v. 88, p. 199–207, 2001.

BOLDUC, N.; OUELLET, M.; PITRE, F.; BRISSON, L.F. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. **Planta**, v. 216, p. 377–386, 2003.

CEITA, G. de O. **Análise do processo de morte celular em *Theobroma L.* induzido por *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer**. 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

CEITA, G.de O.; MACÊDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANO, L.; GESTEIRA, A. da S.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA D.da C.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.de M. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso*. **Plant Science**. v. 173, p. 106-117, 2007.

CESSNA, S.G.; SEARS, V.E.; DICKMAN, M.B.; LOW, P.S. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. **The Plant Cell**, v. 12, p. 2191–2200, 2000.

CHAE, H.J.; KE, N.; KIM, H.R.; CHEN, S.; GODZIK, A.; DICKMAN, M.; REED, J.C. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. **Gene**, v. 323, p. 101–113, 2003. CHRISTENSEN, A.B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZIMMERMANN, GRIT; GJETTING, T.; LYNCKJÆR, M.F.; DUDLER, R.; SCHWEIZER, P. The Germinlike Protein GLP4 Exhibits Superoxide Dismutase Activity and Is an Important Component of Quantitative Resistance in Wheat and Barley. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 1, p. 109–117, 2004.

COEGO, A.; RAMIREZ, V.; GIL, M. J.; FLORS, V.; MAUCH-MANI, B.; VERA, P. An Arabidopsis Homeodomain Transcription Factor, OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3, Mediates Resistance to Infection by Necrotrophic Pathogens. **The Plant Cell**, p. 1 – 15, 2005.

CURTIS, M.J.; WOLPERT, T.J. The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. **Plant Journal**, v. 29, p. 295–312, 2002

DANGL, A.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, R.A. Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN, B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American society of plant physiologists**, p. 1044-1100, 2000.

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

DAWES, N.; GLASSEY, J. Normalisation of multicondition cDNA macroarray data. **Comparative and Functional Genomics**, p. 1-12. 2007.

DOUKHANINA, E.V.; CHEN, S.; VAN DER ZALM, E.; GODZIK, A.; REED, J.; DICKMAN, M.B. Identification and functional characterization of the BAG protein family in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 18793–18801, 2006.

DREW, M.C.; HE, C-J.; MORGAN P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 3, p. 123-127, 2000.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOSTEIN D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA Genetics**, v, 95, p. 14863–14868, 1998.

ESPINOSA, A.; GUO, M.; TAM, V.C.; FU, Z.Q.; ALFANO, J.R. The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. **Mol Microbiol**, v.49, p. 377–387, 2003.

FATH, A.; BETHKE, P.; LONSDALE, J.; MEZA-ROMERO, R.; JONES R. Programmed cell death in cereal aleurone. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 255–266, 2000.

FREITAS, V.M; MENDES, M.A.S. Espécies de fungos exóticas para a cultura do cacau. **Embrapa** – Comunicado técnico, Brasília, set. 2005, 10p.

FUKUDA, H. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 299–325, 1996.

GARCIA, D.; MATTOS, C.R.R.; GONÇALVES, P.de S.; LE GUEN, V. Selection of rubber clones to South American Leaf Blight in the germplasm of the Michelin plantation of Bahia (Brazil). **Journal of rubber research**, v. 7, n. 3, p. 188-198, 2004.

GARCIA, D.; TROISPOUX, V.; GRANGE, N.; RIVANO, R.; D'AUZAC, J. Evaluation of the resistance of 36 *Hevea* clones to *Microcyclus ulei* and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. **European Journal of Forest Pathology**, v. 29, p. 323-338, 1999.

GARCIA, D. **Contribution à l'étude de la résistance totale et partielle dans l'interaction hôte-parasite *Hevea* spp - *Microcyclus ulei*. Aspects histologiques et biochimiques des réactions impliquées dans ces résistances.** 1995a, 216p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Université de Montpellier II, 1995a.

GARCIA, D.; SANIER, C.; MACHEIX, J.J.; D'AUZAC, J; Accumulation of scopoletin in *Hevea brasiliensis* infected by *Microcyclus ulei* (P. Henn) c. Arx and evaluation of its fungitoxicity for three leaf pathogens of rubber tree. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 47, p. 213-223, 1995b.

GARCIA, D.; CAZAUX, E.; RIVANO, F.; D'AUZAC J. Chemical and structural barriers to *Microcyclus ulei*, the agent of South American leaf blight, in *Hevea* spp. **European Journal of Forest Pathology**, v. 25, p. 282-292, 1995c.

GARCÍA-OLMEDO, F.; RODRIGUEZ-PALENZUELA,P.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J.M.; LÓPEZ-SOLANILLA, E.; BERROCAL-LOBO, M.; POZA-CARRIÓN, C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence. **FEBS Letters**, v. 498, p. 219-222, 2001.

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FERREIRA, F.A. **Doenças da Seringueira no Brasil.** EMBRAPA-SPI, Brasília, 1997. 168p.

GASPAROTTO, L.; JUNQUEIRA, N.T.V. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, causal agent of rubber tree leaf blight. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 22-24, 1994.

GIULIANI, C.; CONSONNI, G.; GAVAZZI, G.; COLOMBO, M.; DOLFINI, S. Programmed cell death during embryogenesis in maize. **Annals of Botany**, V. 90. P. 287–292, 2002.

GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, p. 179–191, 1990.

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.

GREENBERG, J.T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 8, p. 525-545, 1997.

GREENBERG, J.T.; YAO N. The role and regulation of programmed cell death in plant pathogen interactions. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 201-211, 2004.

GROOVER, A.; JONES, A. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. **Plant Physiology**, v. 119, p. 375-384, 1999.

GROOVER, A.; DEWITT, N.; HEIDEL, A.; JONES, A. Programmed cell death of plant tracheary elements differentiating in vitro. **Protoplasma**, v. 196, p. 197–211, 1997.

HALLÉ, F.; OLDEMAN, R.A.; TOMLINSON, P.B. (1978) Tropical trees and forest. In: GASPAROTTO, L.; SANTOS, A.F.; PEREIRA, J.C.R.; FERREIRA, F.A. **Doenças Da Seringueira no Brasil**. EMBRAPA-SPI, Brasília, 1997. 168p.

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

HANCOCK, J.T.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; NEILL, S.J. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 611-617, 2002.

HASHIM, I.; CHEE, K.H.; DUNCAN, E.J. Reaction of *Hevea* leaves to infection with *Microcyclus ulei*. **Journal of Rubber Research Institute of Malaysia**, v. 26, p. 67-72, 1978.

HANSEN, G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, v. 13, p. 649–657, 2000.

HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular and Biology**, v. 44, p. 321-334, 2000.

HOLLIDAY, P. **South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) of *Hevea brasiliensis***. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1970, 31p.

HÜCKELHOVEN, R.; DECHERT, C.; KOGEL, K.-H. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 100, p. 5555–5560, 2003.

HUH, G.H.; DAMSZ, B.; MATSUMOTO, T.K.; REDDY, M.P.; RUS, A.M.; IBEAS, J.I.; NARASIMHAN, M.L.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. **Plant Journal**, v. 29, p. 649–659, 2002.

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

KAWAI-YAMADA, M.; OHMORI, Y.; UCHIMIYA, H. Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. **Plant Cell**, v. 16, p. 21–32, 2004b.

KAWAI-YAMADA, M.; JIN, L.; YOSHINAGA, K.; HIRATA, A.; UCHIMIYA, H. Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, p. 12295–12300, 2001.

KEON, J.; ANTONIW, J.; CARZANIGA, R.; DELLER, S; WARD, J.L.; BAKER, J.M.; BEALE, M.H; HAMMOND-KOSACK, K.; RUDD, J.J. Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to Programmed Cell Death (PCD) of

its susceptible wheat host. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 2, p. 178-193, 2007.

KIM, K.; MIN, J.; DICKMAN M. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 5, p. 605-612, 2008.

LE GUEN, V.; MATTOS, C.R.R.; GUYOT. J.; SEGUIN, M.; GARCIA D. Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. **Crop Protection**. v.27, p. 1498-1503, 2008.

LI, W.; DICKMAN, M.B. Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 87–95, 2004.

LIEBEREI, R. South American Leaf Blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany**. p. 1-18, 2007.

LINCOLN, J.E.; RICHAEI, C.; OVERDUIN, B.; SMITH, K.; BOSTOCK, R.; GILCHRIST, D.G. Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 99, p 15. 2002.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; CZYMMEK, K.; TALLOCY, Z.; LEVINE, B.; DINESH-KUMAR S.P. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. **Cell**, v. 121, n. 4, p. 567-577, 2005.

MARTINEZ, A. A. Borracha: São Paulo é o maior produtor nacional. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/artigos/borracha/index.htm>>. Acesso em: 09 fev. 2010.

MATSUMURA, H.; NIRASAWA, S.; KIBA, A.; URASAKI, N.; SAITOH, H.; ITO, M.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H.; 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, 2004.

MATTOS, C.R.R.; GARCIA, D.; PINARD, F.; LE GUEN, V. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no Sudeste da Bahia. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 502-507, 2003.

MATTOS, C.R.R. Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de *Microcyclus ulei*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 470, 1999.

MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, v. 105, p. 467–472, 1994.

MITTLER, R.; LAM, E. *In situ* detection of nDNA fragments during the differentiation tracheary elements in higher plants. **Plant Physiology**, v. 108, p. 489-493, 1995.

NAVARRE, D.A.; WOLPERT, T.J. Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. **Plant Cell**, v. 11, p. 237–249, 1999.

NOODÉN, L.D. **Plant Cell Death Process**. Elsevier Academic Press, San Diego: Califórnia, 2004. 392p.

OBARA, K.; KURIYAMA, H.; FUKUDA, H. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in zinnia. **Plant Physiology**, v. 125, p. 615-626, 2001.

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

PEYYALA, R.; FARMAN, M.L. *Magnaporthe oryzae* isolates causing gray leaf spot of perennial ryegrass possess a functional copy of the AVR1-CO39 avirulence gene. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 157–165, 2006.

PITA, F.A. de O.; OLIVA, M.A. Identificação e concentração das antocianinas durante a ontogenia foliar de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg (IAN873) e *H. pauciflora* Meull. Arg. submetidos a dois regimes hídricos. **Acta Amazônica**, v. 17, p. 189-196, 1987.

RESENDE, M.L.V; SALGADO, S.M.L; CHAVES, Z.M. Espécias ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

ROSSMANN, H. Amazonas retoma produção de borracha. **Borracha via e-mail. Editorial**, Ano VI, n. 272, 19 abril 2006.

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

SAMBUGARO, R. **Caracterização anatômica foliar de clones de seringueira (*Hevea* spp.) visando a resistência ao *Microcyclus ulei***. 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Unesp, Botucatu, 2003.

SAMBUGARO, R.; FURTADO, E.L.; RODELLA, R.A.; MATTOS, C.R.R. Anatomia foliar de seringueira (*Hevea* spp.) e desenvolvimento da infecção por *Microcyclus ulei*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 51-56, 2004.

SANCHEZ, P.; ZEBALA, M. de T.; GRANT, M. AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. **Plant Journal**, v. 21, p. 393–399, 2000.

SHAPIRO, A.D.; ZHANG, C. The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1089–1101, 2001.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, p. 431-443, 1999.

SOUZA, V.L. **Expressão gênica, respostas morfo-fisiológicas e morte celular induzidas por cádmio em *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética e biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, p. 661–67, 1995.

SUOMENG, D.; ZHENG GUANG, Z.; XIAOBO, Z.; YUANCHAO, W. Mammalian pro-apoptotic bax gene enhances tobacco resistance to pathogens. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1559–1569, 2008.

TORRES, L.E.S.; VARGAS F.D. Apoptosis: the phenomenon and its determination. **Técnica Pecuaria en México**, v. 41, p. 49-62, 2003.

VAN DER BIEZEN, E.A.; JONES, J.D.G. The NB-ARC domain: A novel signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. **Current Biology**, v. 8, p. 226–227, 1998.

VAN BAARLEN, P.; STAATS, M.; VAN KAN, J.A.L. Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 559-574.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

WANG, M.; OPPEDIJK, B.J.; LU, X.; VAN DUIJIN, B.; SCHILPEROORT, R.A. Apoptosis in barley aleurone during germination and its inhibition by abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 1125-1134, 1996.

WILLIAMS, B.; DICKMAN, M. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 4, p. 531 – 544, 2008.

WISE, R.P.; MATTHEW, J.M.; ADAM, J. B.; WHITHAM, S.A. Transcript profiling in host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 329-369, 2007.

YAO, N.; IMAI, S.; TADA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; PARK, P.; MAYAMA S. Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 1000-1007, 2002.

YOUNG, T. E.; GALLIE, D. R. Programmed cell death during endosperm development. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 283-301, 2000.

ZHANG, C.; CZYMMEK, L.J.; SHAPIRO A.D. Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling

governing progression of the Arabidopsis hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 962–972, 2003.