



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**FREDY DAVI ALBUQUERQUE SILVA**

**HOMEOSTASE REDOX, GENES ASSOCIADOS E A**  
**RESISTÊNCIA DO FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.)**  
**Walp.] AO FUNGO HEMIBIOTRÓFICO *Colletotrichum***  
***gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.]**

**FORTALEZA – CE**  
**2015**

**FREDY DAVI ALBUQUERQUE SILVA**

**HOMEOSTASE REDOX, GENES ASSOCIADOS E A  
RESISTÊNCIA DO FELJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.)  
Walp.] AO FUNGO HEMIBIOTRÓFICO *Colletotrichum*  
*gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.]**

Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de concentração Bioquímica Vegetal.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

S578h Silva, Fredy Davi Albuquerque.  
Homeostase redox, genes associados e a resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] ao fungo hemibiotrófico *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.]. – 2016.  
142 f. : il., color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2016.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

1. Feijão-de-corda. 2. Antioxidantes. 3. Fungos. I. Título.

---

CDD 574.192

## BANCA EXAMINADORA

Tese aprovada em : 24 / 03 / 2015



Fredy Davi Albuquerque Silva



---

PhD. José Tadeu Abreu de Oliveira (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará – UFC



---

Dr. Enéas Gomes Filho (Membro interno)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará - UFC



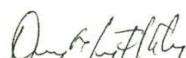
---

Dr. José Hélio Costa (Membro interno)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará – UFC



---

Dr. Cléberon de Freitas Fernandes (Membro externo)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa – Rondônia



---

Dra. Darcy Mayra Furtado Gondin (Membro externo)  
Departamento de Farmácia  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

“Os pais somente podem dar bons conselhos e indicar bons caminhos, mas a formação final do caráter de uma pessoa está em suas próprias mãos”.

*Anne Frank*

## AGRADECIMENTOS

A minha família que é minha base e meu apoio em todos os momentos e decisões da minha vida.

Ao meu orientador Professor José Tadeu Abreu de Oliveira pelo exemplo de profissional, pesquisador ético, pela atenção, ensinamentos e minuciosa orientação no decorrer desses anos.

Ao Professor José Hélio Costa pela criteriosa orientação na condução dos experimentos de análise de expressão gênica.

Ao Professor Emílio de Castro Miguel pela valiosa colaboração nos experimentos de microscopia de varredura junto a Central Analítica da UFC.

Ao Professor Francisco de Assis Paiva Campos pelos valiosos ensinamentos ao longo dos anos de trabalho e estudo no DBBM.

Ao Professor Cléber de Freitas Fernandes pela pronta aceitação em participar da avaliação deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Toxinas Vegetais, coordenado pela Prof. Dra. Ilka Maria Vasconcelos, pelo apoio e por estarem sempre de portas abertas.

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho: Pedro, Rodolpho, Anna Lídia, Thiago, Ana Luiza, Ivna, Handerson, Larissa, Emanuel, Raíssa, Juliana, Luca e Louise. Aos amigos ex-LPVD que conviveram comigo durante o período de doutorado. Darcy Mayra e Alexandra, pelo carinho de sempre, pela amizade e excelentes dicas científicas e conversas da vida.

De uma forma bem especial, a todos os amigos, e não foram poucos, que tive o prazer de conhecer e conviver durante esses mais de 10 anos de trabalho, por contribuir de forma direta e indireta não somente para minha formação profissional, mas para minha formação pessoal.

Agradeço à minha mãe Rejane, meu Pai Raimundo e meus três irmãos Joana, Victor e Débora que sempre farão parte da minha vida, e que foram imprescindíveis para que esse momento pudesse se concretizar.

A Juliana Rodrigues que nos momentos de desânimo me deu forças e alegria pra continuar em frente e sempre acreditando. Obrigado por me fazer observar tudo sobre várias formas.

A todos que contribuíram para realização desse trabalho.

Muito obrigado.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Todas as análises experimentais conduzidas nesse trabalho de tese foram executadas com o apoio e fomento dos seguintes Programas/Instituições/Laboratórios de pesquisa:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ** - através das atividades de treinamento, suporte estrutural e no ensino e pesquisa em Bioquímica. **Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa - Lpvd, Laboratório de Proteínas Tóxicas – Labtox e Laboratório de Bioenergética em Sistemas Vegetais**, onde os procedimentos experimentais foram realizados.

**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)** - através da concessão de bolsa de doutorado e de fomentos à pesquisa.

**COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** - pela contribuição para formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

**A CENTRAL ANALÍTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ** – por proporcionar a realização das análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) aprimorando o desenvolvimento do conhecimento científico.



## RESUMO

*Colletotrichum gloeosporioides* é um importante patógeno hemibiotrófico com uma ampla gama de hospedeiros que causa perdas substanciais de colheitas. Dados recentes mostraram que a resposta hipersensitiva (HR) é um evento envolvido na resistência do feijão-de-corda (*V. unguiculata*) genótipo BR-3 contra *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1). Vários estudos têm sido realizados sobre os mecanismos de defesa de plantas a patógenos hemibiotróficos, mas em geral eles continuam a ser mal compreendidos. Anteriormente, comparamos mudanças na expressão de proteínas induzidas em genótipos resistentes de feijão-de-corda após a infecção com *C. gloeosporioides* utilizando uma abordagem proteômica. Com base nesses resultados, no presente estudo, avaliamos as respostas de defesa induzidas por *C. gloeosporioides* em *V. unguiculata* associadas com a explosão oxidativa, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), bem como a expressão de genes antioxidantes, utilizando análise por RT-qPCR. Ao mesmo tempo foi analisada a cinética de infecção de *C. gloeosporioides* por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O aumento de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  foi detectado em feijão-de-corda, 2 horas após a inoculação (hai) utilizando coloração por NBT e DAB, respectivamente. A quantificação espectrofotométrica demonstrou dois picos de produção de  $H_2O_2$ , 2 e 12 hai, mostrando uma cinética bifásica. O aumento de  $H_2O_2$  foi acompanhado por peroxidação lipídica 2 e 48 hai. As análises de MO e MEV mostraram que *C. gloeosporioides* foi capaz de gerar estruturas tais como tubos germinativos e apressórios e se desenvolver sob a superfície das folhas. No entanto, apesar do desenvolvimento e tentativa de infecção, alterações ultra-estruturais foram observadas na superfície de conídios e hifas 8 hai levando a não infecção de células hospedeiras. Análise por RT-qPCR demonstrou que os genes *VuFeSODI* e *VuCuZnSODII* apresentaram aumento de expressão 4 hai, enquanto que o gene *VuCuZnSODI* foi bem expresso 12 hai. Em relação aos genes associados à regulação de  $H_2O_2$ , *VuPrxIIBCD* mostrou uma forte aumento de transcritos em 2 hai enquanto que, *VuAPXI* mostrou aumento de expressão apenas 12 hai. *VuCATI* e *VuCATII* mostram aumento de expressão quantitativa dos transcritos 12 hai, indicando que eles são associados a manutenção de  $H_2O_2$  em peroxissomos. Contrariamente, a expressão dos transcritos de *VuPrxIIE* foi reprimida nas primeiras horas após a inoculação, contudo, apresentaram níveis aumentados de expressão em 48 hai, sugerindo participar na regulação de  $H_2O_2$  nos cloroplastos. O presente estudo indica que  $H_2O_2$  tem um papel importante nas estratégias de defesa iniciais de feijão-de-corda, agindo contra *C. gloeosporioides* e funcionando como uma molécula sinalizadora. Além disso, os genes associados com defesas antioxidantes estudados parecem estar envolvidos, em combinação com outras moléculas, na regulação dos níveis de  $H_2O_2$  para prevenir a morte celular e regular a homeostase redox, eventos importantes nos mecanismos de resistência de plantas a patógenos.

Palavras chave: Defesa, *Colletotrichum gloeosporioides*, peróxido de hidrogênio, metabolismo redox, patógeno hemibiotrófico

## ABSTRACT

*Colletotrichum gloeosporioides* is an important hemibiotrophic pathogen with a broad host range that causes substantial crop losses. Recent data have shown that the hypersensitive response (HR) is one event involved in the resistance of cowpea (*V. unguiculata*) genotype BR-3 against *C. gloeosporioides* (LPVD-1 isolate). Several studies have been undertaken on the defense mechanism of plant to hemibiotrophic pathogen, but overall they remain poorly understood. Previously, we have compared changes in protein expression induced in resistant cowpea genotype after infection with *C. gloeosporioides* using a proteomic approach. Based on these results, in the present study, we evaluated the defense responses induced by *C. gloeosporioides* in *V. unguiculata* associated with oxidative burst, accumulation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as well expression of antioxidant genes using RT-qPCR analysis. At the same time, we analyzed the *C. gloeosporioides* infection kinetics by optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM). Increased  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  was detected in cowpea 2 hours after inoculation (hai) using NBT and DAB staining, respectively. Spectrophotometric measurements showed two peaks  $H_2O_2$  production, 2 and 12 hai, showing a biphasic kinetics. The increase of  $H_2O_2$  was accompanied by lipid peroxidation 2 and 48 hai. OM and SEM analyzes showed that *C. gloeosporioides* was able to generate germ tubes and structures such as aplanospores and develop under the surface of the leaves. However, despite of the development and attempt to infection, ultra-structural changes were observed on the surface of conidia and hyphae, 8 hai led to no infection of host cells. Analysis by RT-qPCR demonstrated that the genes *VuFeSODI* and *VuCuZnSODII* are up-regulated in chloroplasts at 4 hai, while the gene *VuCuZnSODI* was well up-regulated 12 hai. In relation to genes associated to scavenging of  $H_2O_2$ , *VuPrxIIBCD* showed a strong up-regulated of transcript at 2 hai while that *VuAPXI* showed up-regulated only 12 hai. *VuCATI* and *VuCATII* showed that the quantitative level of transcript expression was up-regulated 12 hai, indicating that they are important in the maintenance of  $H_2O_2$  in peroxisomes. Contrarily, *VuPrxIIE* transcript was down-regulated in the early hours after inoculation, but showed increased expression levels at 48 hai suggesting participate in the regulation of  $H_2O_2$  in chloroplasts. The present study indicates that  $H_2O_2$  has an important role in the initial defense strategies of cowpea acting against *C. gloeosporioides* and functioning as a signaling molecule. Furthermore, genes associated with antioxidant defenses studied here seem to be involved, in combination with other molecules, in the regulation of  $H_2O_2$  levels toward preventing cell death and regulating the cell redox homeostasis, important events in the resistance mechanisms of plants to pathogens.

**Keywords:** Defense, *Colletotrichum gloeosporioides*, hydrogen peroxide, redox metabolism, hemibiotrophic pathogen

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

**Figura 1.** Mecanismo de infecção intracelular adotadas por espécies do gênero *Colletotrichum*.....16

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

**CAPÍTULO I**

- Figura 1.** Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos cDNAs das *PRXs* de *V. unguiculata*.....32
- Figure 2.** Análise filogenética das sequências de cDNA de *PRXs* de Vu; *V. unguiculata*, Pv; *P. vulgaris* (ordem Fabales), At; *A. thaliana* (ordem Brassicales) e Os; *O. sativa* (ordem Poales).....34
- Figura 3.** Eletroforese de gel de agarose 1% (v/v) dos produtos resultantes da reação de PCR semi-quantitativa com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os oito genes *Vu1Cysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuprxIIBCD*, *VuprxIIE*, *VuprxIIFI*, *VuprxIIFII* de peroxirredoxinas.....36
- Figura 4.** Curvas de dissociação obtidas por RT-qPCR usando *primers* específicos para peroxirredoxinas.....38

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

**CAPÍTULO II**

- Figura 1.** Cultivo da cultura monospórica de *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1).  
(A): cultura monospórica em meio BCA.....51
- Figura 2.** Folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides* ( $2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>).....69
- Figura 3.** Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visto por microscopia de luz.....71
- Figura 4.** Acúmulo de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides*.....74
- Figura 5.** Presença e teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides*.....75
- Figura 6.** Teor de proteína e peroxidação de lipídeos em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculado com *C. gloeosporioides*.....77
- Figura 7.** Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....79
- Figura 8.** Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....81
- Figura 9.** Integridade dos RNAs extraídos de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, visualizado em gel de agarose (1,5%), evidenciando as bandas do RNA ribossomal 18S e 28S. ....84
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de amplificação do gene do fator de alongação 1 beta (*EF1β*), para avaliação da qualidade do cDNA produzido nas reações de PCR semi-quantitativa de amostras oriundas de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, em 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após infecção (HAI) com *C. gloeosporioides*.....85

- Figura 11.** Valores médios dos limiares de detecção (*Ct*) (A), média de estabilidade de expressão (M) (B), variação dos pares de genes (V) (C) para *Insu*, *Act5*, *EF1a2*, *EF1a3*, *EF1b* e *PhaFbox*, obtidos a partir dos cDNAs de 48 amostras de plantas controles e inoculadas.....87
- Figura 12.** Expressão relativa dos genes antioxidantes *VuFeSODI*, *VuCuZnSODI* e *VuCuZnSODII* em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com *C. gloeosporioides* em relação a folhas primárias tratadas com água destilada estéril (controles).....90
- Figura 13.** Expressão relativa dos genes antioxidantes *VuAPXI*, *VuCATI*, *VuCATII*, em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com *C. gloeosporioides* em relação a folhas primárias tratadas com água destilada estéril (controles).....91
- Figura 14.** Expressão relativa dos genes antioxidantes *Vu1Cysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*, *VuPrxIIFI*, *VuPrxIIFII*, em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com *C. gloeosporioides* em relação a folhas primárias tratadas com água destilada estéril (controles).....92
- Figura 15.** Mecanismo hipotético das respostas de defesa do feijão-de-corda, genótipo BR 3, contra o fungo hemibiotrófico *C. gloeosporioides*.....107

---

**LISTA DE TABELAS**

---

**CAPÍTULO I**

**Tabela 1.** Sequências de referência de cDNA de *PRXs* usadas para anotação de genes de *V. unguiculata*.....23

**Tabela 2.** Sequência dos iniciadores de *PRXs*, tamanho do amplicon, número de acesso e temperatura de fusão definidos pelo programa *Perl primer*.....28

---

**LISTA DE TABELAS**

---

**CAPÍTULO II**

**Tabela 1.** Sequência dos iniciadores dos genes alvos e de referência (normalizadores), tamanho do fragmento a ser amplificado (*amplicon*), número de acesso e temperatura ótima de fusão dos genes avaliados.....63

**Tabela 2.** Valores médios das concentrações e relações de absorvâncias dos RNAs extraídos de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, controle e inoculado com *C. gloeosporioides*.....83

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

---

1. APX – Peroxidase do ascorbato
2. BLAST – Ferramenta de busca de alinhamento local
3. CAT - Catalase
4. cDNA – DNA complementar
5. *Cg* – *Colletotrichum gloeosporioides*
6. Ct – Ciclo threshold
7. DAB - Diaminobenzidina
8. DAF – Dias após a floração
9. DAMP - Damage-associated molecular patterns
10. DAS – Dias após a semeadura
11. dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato
12. DNase – Desoxirribonuclease
13. EROs – Espécies reativas de oxigênio
14. EST – Expressed Sequence Tags
15. HR – Resposta hipersensitiva
16. MAMP - *Microbe-associated molecular patterns*
17. MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio
18. mM – Milimolar
19. *Cont* – plantas controle
20. NBT - nitroazul de tetrazolium
21. NCBI – Centro nacional de informação biotecnológica
22. ng – Nanograma
23. nM – Nanomolar
24. PAMP – *Pathogen or microbe-associated molecular patterns*
25. Pb – Pares de bases
26. POX – Peroxidase dependente de fenol
27. PRR - *Pattern Recognition Receptors*
28. PRXs - Peroxirredoxina
29. PrxQ – Peroxirredoxina Q
30. PrxII – Peroxirredoxina tipo II



31. RPM – Rotações por minuto
32. RT – PCR – Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase
33. RT – qPCR - Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa
34. SAR – *Systemic Acquired Resistance*
35. SOD – Dismutase do superóxido
36. TBAR – Ácido tiobarbitúrico
37. TCA – Ácido tricloracético
38. Taq – *Thermus aquaticus*
39. Tm – Temperatura de desnaturação
40. µg - Microgramas

---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS REFERENCIAL TEÓRICO.....	VI
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I.....	VII
LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Importância do feijão-de-corda [<i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.].....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Interação planta-patógeno e participação das EROs.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Sistemas enzimáticos antioxidantes em plantas.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.1 Dismutases do superóxido (SOD).....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.2 Peroxidases do ascorbato (APX).....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.3 Catalases (CAT).....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.4 Peroxirredoxinas (PRXs).....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 Mecanismos moleculares da interação entre feijão-de-corda (<i>V. unguiculata</i> [L.] Walp.) e <i>C. gloeosporioides</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>19</b>

---

## CAPÍTULO I

---

<b>1. OBJETIVO.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Objetivos geral.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Materiais.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Métodos Experimentais.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1 Anotação dos genes de peroxirredoxinas (<i>PRXs</i>) de feijão-de-corda.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3 Alinhamento das sequências de aminoácidos das PRX deduzidas.....</b>	<b>24</b>

2.2.4 Viabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs por PCR semi-quantitativa.....	25
2.2.5. Viabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs por RT-qPCR.....	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1 Anotação dos genes de peroxirredoxinas (PRXs) de feijão-de-corda e análise das sequências de aminoácidos.....	28
3.2 Alinhamento das sequências de aminoácidos das PRX deduzidas a partir dos cDNA e análise filogenética das seqências de cDNA.....	33
3.3 Viabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs por PCR semi-quantitativa.....	35
3.4 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores específicos por RT-qPCR.....	37
4. DISCUSSÃO.....	39
4.1 Anotação dos genes de peroxirredoxinas (PRXs) de <i>Vigna unguiculata</i> e análise das sequências de aminoácidos.....	39
4.2 Alinhamento das sequências e análise filogenética.....	41
4.3 Análise dos oligonucleotídeos iniciadores específicos por PCR semi-quantitativa e RT-qPCR quantitativa.....	42

---

## CAPÍTULO II

---

1. HIPÓTESE.....	45
2. OBJETIVOS.....	45
2.1 Objetivos geral.....	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 Reagentes.....	47
3.2 Material biológico.....	47
3.2.1 Sementes de feijão-de-corda [ <i>V. unguiculata</i> (L.) Walp.] genótipo BR-3.....	47
3.2.2 Fungo fitopatogênico.....	48
3.3 Método experimental.....	48

3.3.1 Germinação e cultivo das plantas.....	48
3.3.2 Aumento da patogenicidade do fungo <i>C. gloeosporioides</i> .....	49
3.3.3 Cultivo e obtenção da suspensão de conídios de <i>C. gloeosporioides</i> .....	52
3.3.4 Inoculação com a suspensão de conídios de <i>C. gloeosporioides</i> e coleta das folhas.....	52
3.3.5 Análise macroscópica dos sintomas da Infecção.....	53
3.3.6 Quantificação de proteínas .....	53
3.3.7 Determinação qualitativa da presença de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ).....	54
3.3.8 Determinação qualitativa da presença de peróxido de hidrogênio.....	54
3.3.9 Determinação quantitativa do teor de peróxido de hidrogênio.....	55
3.3.10 Peroxidação de lipídeos TBARs.....	56
3.3.11 Análise microscopica da cinética de infecção do feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo <i>C. gloeosporioides</i> .....	56
3.3.11.1 Análise por microscopia óptica (MO).....	56
3.3.11.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da cinética de infecção do feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo <i>C. gloeosporioides</i> .....	57
3.3.12 Análise de expressão de genes alvo por RT-qPCR.....	58
3.3.12.1 Extração e purificação dos RNAs.....	58
3.3.12.2 Análise da integridade, quantificação e pureza dos RNAs totais.....	59
3.3.12.3 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR) para síntese do DNA complementar (cDNA).....	61
3.3.12.4 Iniciadores específicos dos genes de referência e alvos usados na análise de expressão, por transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	61
3.3.12.5 Análise de expressão dos genes alvo por RT-qPCR.....	65
3.3.12.6 Seleção, estabilidade de expressão e validação dos genes normalizadores do feijão-de-corda, em resposta à infecção pelo <i>C. gloeosporioides</i> .....	65
3.3.12.7 Análises de expressão relativa dos genes.....	66
3.3.12.8 Análises estatísticas.....	66
4. RESULTADOS.....	68
4.1 Avaliação da presença de lesões em folhas de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com <i>C. gloeosporioides</i> .....	68

4.2 Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo <i>C. gloeosporioides</i> , visto por microscopia de luz.....	70
4.3 Avaliação da presença do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em folhas primárias de feijão-de-corda.....	72
4.4 Avaliação qualitativa e quantitativa da presença de peróxido de hidrogênio em folhas primárias de feijão-de-corda.....	72
4.5 Conteúdo de proteínas solúveis e teor de peroxidação de lipídeos.....	76
4.6 Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo <i>C. gloeosporioides</i> , visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	78
4.7 Perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo antioxidante de feijão-de-corda, genótipo BR-3, em resposta a infecção pelo fungo <i>C. gloeosporioides</i> .....	82
4.7.1 Teor e integridade do RNA extraído por eletroforese em gel de agarose.....	82
4.7.2 Normalização dos genes de referência por RT-qPCR.....	87
4.7.3 Expressão dos genes alvo envolvidos no metabolismo antioxidante de feijão-de-corda, genótipo BR-3, em resposta a infecção pelo <i>C. gloeosporioides</i> .....	88
5. DISCUSSÃO.....	94
5.1 Interação entre o feijão-de corda <i>V. unguiculata</i> genótipo BR-3 e o fungo <i>C. gloeosporioides</i> (isolado LPVD-1).....	94
6. CONCLUSÕES.....	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8. ANEXOS.....	112

---

## 1. INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda é um dos mais importantes constituintes da dieta da população no Brasil por ser uma rica fonte de proteína (23-32% do peso seco), carboidratos e principalmente ferro (HALL *et al.*, 2003). Cultivado por diversos produtores em várias regiões brasileiras, o feijão destaca-se como uma cultura com características que conferem uma boa adaptação a variados climas (KIMATI, *et al.*, 1997; FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). Embora bem adaptado às condições climáticas, o feijão-de-corda enfrenta estresses de natureza biótica como bactérias, fungos, insetos, vírus e nematoídes que causam significativa perda de produtividade. Sob condições de estresse, como o ataque de patógenos, as plantas respondem expressando um largo conjunto de genes relacionados à defesa, que desencadeiam eventos bioquímicos como fosforilação de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e o radical livre hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) assim como espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO) e o peróxinitrito ( $ONOO^-$ ) conduzindo a respostas de defesa localizadas que atuam no combate ao patógeno (NÜRNBERGER; KEMMERLING, 2009; DAS *et al.*, 2008). Entretanto, apesar da reconhecida atividade antimicrobiana essas espécies podem gerar danos celulares. Entre as EROs, o peróxido de hidrogênio tem demonstrado ter um papel central na resistência de plantas em diversos fitossistemas. O  $H_2O_2$  destaca-se como um das EROs mais quimicamente estáveis, estando envolvido com processos celulares relacionados às vias de sinalização de defesa de plantas (TORRES; JONES; DANDL, 2006). Além de molécula sinalizadora, o  $H_2O_2$  pode atuar diretamente sobre o patógeno impedindo seu crescimento e funcionar também como mensageiro secundário induzindo respostas de defesa sistêmica (LAMB; DIXON, 1997). Em relação à interação entre feijão-de-corda com o fungo

---

*Colletotrichum gloeosporioides* estudos têm demonstrado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresenta funções importantes na regulação do desenvolvimento do patógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Contudo, uma questão bastante relevante recai sobre a toxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem como de outras EROs, e seu papel nos mecanismos de sinalização. Sendo assim, a regulação da produção e remoção desses radicais faz-se necessário por parte das plantas. A grande produção dessas EROs em excesso, leva ao estresse oxidativo e tem como consequência uma perturbação da homeostase celular (PEREZ; BROWN, 2014). Esse desequilíbrio dirige a ativação de mecanismos não enzimáticos de remoção desses radicais, que incluem a produção de antocianinas, ascorbato, carotenóides, bem como de mecanismos enzimáticos, como expressão de dismutases de superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX), catalases (CAT) e peroxirredoxinas (PRX). Assim, o presente trabalho tem como intuito estudar os mecanismos de resistência do feijão-de-corda ao *C. gloeosporioides* bem como entender o papel das EROs e dos sistemas enzimáticos antioxidantes no mecanismo de defesa e manutenção da homeostase redox.

---

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Importância do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

O feijão-de-corda destaca-se como uma das principais culturas no Brasil. Em termos sistemáticos é classificado como uma dicotiledônea pertencente à ordem Fabales, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolineae*, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011; PADULOSI; NG, 1997). Essa cultura, de origem africana, foi introduzida no Brasil na segunda metade do século XVI pelos colonizadores portugueses, no estado da Bahia (FREIRE-FILHO, 1988; FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). Desde então, destacou-se como um dos mais importantes alimentos, constituindo parte da dieta de diversas populações que vivem nas regiões dos trópicos semiáridos. Diversas características fisiológicas favoreceram o uso do feijão-de-corda nessas regiões, como tolerância à seca e a capacidade de crescer em solos pobres. Além disso, nos últimos anos, ganhou destaque como uma nova opção para os agricultores em detrimento de outras culturas que apresentam custo de produção mais elevado e que dependem de grandes volumes de insumos, como fertilizantes e defensivos agrícolas. Nos últimos anos, o plantio de feijão-de-corda passou por intensas modificações, destacando-se o aumento da produtividade, principalmente, na terceira safra. Também, foi observada a expansão do cultivo para outras áreas, como a região norte e, ainda, para o centro-oeste, onde é incorporado como safrinha após o plantio de outras culturas (WANDER, 2007). Quando cultivado nessa condição, o feijão passa a ter custo bastante competitivo, o que, atualmente, têm despertado o interesse de produtores. Apesar do aumento da produtividade, a cultura do feijão-de-corda enfrenta problemas de natureza biótica, que afetam seu desenvolvimento,



---

influenciando na qualidade e quantidade de grãos produzidos. Assim, a herbívoros (insetos e nematóides) (CARROLL *et al.*, 2008) e as doenças causadas por fitopatógenos, tais como os vírus, fungos e bactérias, são fatores adversos que comprometem a cultura, sendo os vírus, fungos e nematóides os mais danosos (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2007).

## 2.2 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas

As plantas, em condição de homeostase, produzem, como consequência de seu metabolismo, espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem ser produzidas em diversas organelas da célula vegetal, como nos cloroplastos, peroxissomos e mitocôndria, onde transferências parciais de elétrons para o oxigênio molecular ( $O_2$ ) o reduzem parcialmente, provocando a formação das EROs. São incluídos como EROs o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical livre hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) (MHAMDI *et al.*, 2010). O acúmulo de EROs vai depender do balanço entre sua produção e remoção (MITTLER *et al.*, 2004; MITTLER *et al.*, 2011), que, por sua vez, depende das condições de crescimento, como luminosidade e temperatura ou condições de estresse. O desbalanço de cadeias transportadoras de elétrons, tanto na fotossíntese quanto na respiração, é uma das principais causas da produção de EROs durante o estresse (DAVIDSON; SCHIESTL, 2001). Já nos peroxissomos, o  $H_2O_2$  é produzido quando o glicolato é oxidado a ácido glioxálico durante a fotorespiração (MITTLER *et al.*, 2004; MITTLER *et al.*, 2011). Muitas EROs, como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , e  $HO^{\cdot}$ , são extremamente danosas a moléculas como lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (APEL; HIRT, 2004). Essas espécies podem agir direta ou indiretamente sobre essas moléculas promovendo alterações estruturais, como diminuição da fluidez da membrana, modificações na estrutura do DNA agindo sobre resíduos de guanina,

---

oxidação de carboidratos de membrana ou de parede celular. Podem, ainda, inativar a função celular de proteínas pela ação oxidativa sobre grupos sulfidríla, promover carbanilação de aminoácidos como arginina e histidina, e oxidar resíduos de triptofano (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Nesse aspecto, diversas evidências indicam que a interação das EROs com biomoléculas está associada a vários processos patogênicos (RAY *et al.*, 2012). Sendo assim, a detoxificação do excesso das EROS é essencial para o metabolismo normal e manutenção da homeostase celular.

### **2.3 Interação planta-patógeno e participação das EROs**

As plantas são expostas durante o desenvolvimento a diversos patógenos potencialmente danosos. Esses organismos se utilizam de diversas estratégias que são acionadas no momento da infecção (JONES; DANGL, 2006). Contudo, as plantas dispõem de um sistema de defesa inato capaz de reconhecer o patógeno e acionar mecanismos de defesa. As estratégias desse sistema de defesa inato podem ser divididas em duas respostas principais. A primeira baseia-se na surpreendente capacidade das plantas em reconhecer moléculas conservadas oriundas dos organismos invasores, chamadas de MAMPS (do Inglês, *Microbe-Associated Molecular Patterns*) ou PAMPs (do Inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), que são padrões moleculares conservados associados a microrganismos (patógenos). Esses padrões são reconhecidos através de receptores de reconhecimento desses padrões, PRRs (do Inglês, *Pattern Recognition Receptors*) na superfície da célula da planta (QI *et al.*, 2011; SCHULZE-LEFERT; PANSTRUGA, 2011). Como consequência, é acionado um conjunto de respostas denominados de imunidade induzida por PAMP ou MAMP [PAMP-triggered immunity ou MAMP-triggered immunity (PTI ou MTI)] (BOLLER; FELIX, 2009; SINGH *et al.*, 2012). Uma segunda linha de resposta desse sistema

---

imune baseia-se na percepção de moléculas efetores pela célula através de receptores adicionais como os produtos NBS-LRR (do Inglês, *Nucleotide Binding Site – Leucine Rich Repeat*) dos genes R de resistência (DE YOUNG; INNES, 2006; GURURANI *et al.*, 2012). Essa interação entre os produtos dos genes R de resistência com os produtos dos genes *Avr* de avirulência dos patógenos é conhecida como a hipótese gene-a-gene de Flor (FLOR, 1956), sendo o principal mecanismo pelo qual se determina a compatibilidade ou incompatibilidade na interação entre uma planta e um patógeno. Esse reconhecimento sendo efetivado aciona cascatas de eventos bioquímicos e montam a segunda linha de defesa efetora chamada de imunidade induzida pelo efector (ETI, *Effector-Triggered Immunity*) (CARR *et al.*, 2010; TENA *et al.*, 2011). Assim, em resposta ao reconhecimento de moléculas efectoras, uma série de respostas bioquímicas são induzidas e envolvem transdução de sinais, gerando respostas locais e sistêmicas. Entre as respostas locais, no sítio de infecção, ocorre uma sequência de eventos conhecida como Resposta Hipersensitiva (HR; do Inglês *Hypersensitive Response*) (ENGLER *et al.*, 2005; MUR *et al.*, 2008) a qual está associada ao aumento de permeabilidade da membrana citoplasmática, geração de EROs, efluxo de íons potássio ( $K^+$ ) e espessamento da parede celular (DEL RIO *et al.*, 2006). Entre as EROs geradas, destaca-se o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que pode ser formado no espaço apoplástico como consequência da ativação da oxidase dependente de NADPH presente na membrana. Posteriormente, o ânion superóxido pode ser dismutado formando peróxido de hidrogênio, que pode atuar diretamente como agente antimicrobiano ou, indiretamente, sinalizar vias de respostas, como a síntese de fitoalexinas (MERT-TÜRK, 2002; VELLOSILO *et al.*, 2010), agir no reforço de parede celular, ativação da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à defesa, ou seja, as PR-proteínas (Proteínas Relacionadas à Patogênese) e induzir morte celular programada (LAMB; DIXON, 1997; KIRÁLY *et al.*, 2007; REAPE *et al.*, 2008; LORD; GUNAWARDENA, 2012). Posteriormente, o óxido nítrico produzido na HR, juntamente

---

com o peróxido de hidrogênio, atuam como sinalizadores à longa distância, levando a um tipo de resposta mais geral denominado resistência sistêmica adquirida (SAR, do Inglês *Systemic Acquired Resistance*), que protege toda a planta contra uma subsequente infecção por uma larga variedade de patógenos (DURRANT; DONG, 1996; LUNA *et al.*, 2012).

Assim, a produção de EROs como evento característico da HR, é responsável pela amplificação da resposta de defesa. Entretanto, quando produzido em excesso, as EROs podem ser altamente nocivas. Sendo assim, os excessos dessas espécies necessitam ser regulados pelas plantas para evitar efeitos danosos às células. Nesse sentido, as plantas desenvolveram durante o processo evolutivo, mecanismos de defesa antioxidante como forma de amenizar a toxicidade das EROs às suas células.

## **2.4 Sistemas enzimáticos antioxidantes em plantas**

As plantas dispõem de um elaborado sistema de defesa antioxidante que atua, em cooperação, na remoção de EROs. Esse sistema inclui enzimas antioxidantes, como dismutases de superóxido, peroxidases do ascorbato, catalases e peroxirredoxinas (HELLER; TUDZYNSK 2011; MILLER, 2012). Possuem ainda, compostos antioxidantes não enzimáticos de baixa massa molecular, como glutathiona, alfa-tocoferol e vitamina C.

### **2.4.1 Dismutases de superóxido (SODs)**

As SODs são responsáveis pela conversão do radical livre superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio e compreendem uma importante família de metalo enzimas antioxidantes. Subsequentemente, o peróxido de hidrogênio gerado nessa

---

reação pode ser reduzido à água pela catalase nos peroxissomos e pela peroxidase de glutationa no citosol (MILLER *et al.*, 2010). Estruturalmente, as SODs podem ser classificadas como proteínas homodiméricas ou homotetraméricas com massa molecular de 20 a 80 kDa (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Evidências relacionam as SODs com eventos fisiológicos e situações patológicas, como o estresse biótico (WANG *et al.*, 2011). Em plantas, a família multigênica codifica três grupos distintos de SODs (Fe-SODs, Mn-SODs e Cu/Zn-SODs) sendo classificadas de acordo com o cofator enzimático. As isoformas Fe-SODs estão localizadas nos cloroplastos e constituem o principal mecanismo de proteção foto-oxidativa contra o radical  $O_2^{\bullet-}$  (FOYER; NOCTOR, 2005). Já as Mn-SODs são isoformas encontradas nas mitocôndrias e peroxissomos, enquanto as Cu/Zn-SODs podem ser encontradas, simultaneamente, no citosol, no espaço extracelular, nos cloroplastos e nas membranas dos tilacoides (MILLER, 2012). No mecanismo de defesa de plantas, as SODs podem atuar no sistema de defesa antioxidante conferindo tolerância a estresse oxidativo causado por organismos patogênicos (FAIZE *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 Peroxidases de ascorbato (APXs)**

Em termos funcionais, as APXs reduzem o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  utilizando o ascorbato como doador específico de elétrons (ASADA, 1999). As APXs são heme-proteínas que atuam na proteção do aparato fotossintético contra a ação do  $H_2O_2$ . São descritas como proteínas homodiméricas com massa de 12 a 46 kDa (MITTLER; POULOS, 2005). Nos cloroplastos, estão localizadas na membrana do tilacoide, no lúmen e no estroma (MITTLER *et al.*, 2004). No citosol, podem ser encontradas livres ou em microcorpos, estando, também, presentes nas mitocôndrias ou associadas a organelas (MILLER *et al.*, 2010). Em *Arabidopsis*, as APXs são codificadas por nove genes distintos. Partes desses genes codificam

---

APXs endereçadas para o cloroplasto, que inclui uma APX estromal, uma APX4 que é endereçada para o lúmen, e uma APX6 endereçada ao citosol. Outras duas diferentes APXs são endereçadas para os peroxissomos APX3 e glioxissomos APX5 e outras duas localizadas no citosol (APX1 e APX2). Já a APX7 é encontrada tanto no estroma quanto na mitocôndria indicando ter um duplo endereçamento (SHIGEOKA *et al.*, 2002).

### 2.4.3 Catalases (CATs)

Descritas como oxidoredutases, as CATs, a exemplo das APXs, estão envolvidas na redução de  $H_2O_2$  para  $H_2O$  e  $O_2$  (JANNAT *et al.*, 2012). Em plantas, são encontradas como múltiplas isoformas. Em termos estruturais, são enzimas tetraméricas com quatro subunidades idênticas de 60 kDa, contendo um grupo heme importante na catálise. Em plantas superiores, as catalases são encontradas predominantemente ou exclusivamente em peroxissomos e glioxissomos, onde atuam sobre o  $H_2O_2$ , produto da atividade da oxidase do glicolato (JÜRGEN FEIERABEND, 2005). Dessa forma, o papel fisiológico das catalases contra o estresse oxidativo é fundamental, pois estas enzimas estão localizadas em compartimentos estratégicos onde há a produção localizada de  $H_2O_2$ .

### 2.4.4 Peroxirredoxinas (PRXs)

Peroxirredoxinas (PRXs) constituem uma importante família de tio-peroxidases amplamente distribuídas nos organismos de todos os reinos, desde bactérias até eucariotos (RHEE *et al.*, 2001; DIETZ *et al.*, 2002, DIETZ, 2003, DIETZ, 2011; BHATT; TRIPATHI, 2011). As PRXs foram primeiramente descritas em 1996 em plantas de *Hordeum vulgare* (STACY *et al.*, 1996; BAIER; DIETZ, 1996) e estão entre as 20 proteínas mais

---

abundantes em *A.thaliana* (PELTIER *et al.*, 2006). Desde então, tem-se demonstrado que elas desempenham papel fundamental na detoxificação de EROs provenientes do metabolismo. Essa importância é refletida pela presença de PRXs em diversos compartimentos celulares, onde desempenham funções sítio específicas (DIETZ, 2011). Funcionalmente, tioperoxidasas reduzem hidroperóxidos de alquila e  $H_2O_2$  a álcool e água, respectivamente, pela transferência de elétrons de grupos tiol (SH) presentes em resíduos de cisteína (CHAE *et al.*, 1993). A família das PRXs de plantas pode ser dividida em quatro classes baseada na similaridade de sequência de aminoácidos da estrutura primária, e na posição dos resíduos de cisteína conservados (DIETZ, 2011). No genoma de *A. thaliana*, estão presentes dez genes que codificam as quatro isoformas de PRXs (DIETZ, 2003). De acordo com classificação mais recente, as PRXs podem ser classificadas como: 2-Cis-peroxirredoxinas típicas (2CysPrx); 1-Cis-peroxirredoxinas (1CysPrx); peroxirredoxinas Q (PrxQ); e peroxirredoxinas tipo II (PrxII), podendo, essas duas últimas classes, ser classificadas como 2-Cis-peroxirredoxinas atípicas (NOGUERA *et al.*, 2006). Na região N-terminal de todas as quatro classes de PRXs, é encontrada uma cisteína (denominada de cisteína peroxidásica Cys-Sp) que está envolvida na redução de hidroperóxidos. No mecanismo catalítico, a primeira etapa de reação se dá pela oxidação do grupo tiol da cisteína peroxidásica gerando ácido sulfênico (Cys-SpOH). No caso das 2CysPrxs típicas, essas isoformas possuem uma segunda cisteína na porção C-terminal denominada de cisteína de resolução (Cys-Sr), com a qual o ácido sulfênico reage rapidamente, formando uma ponte dissulfeto intermolecular (KÖNIG *et al.*, 2003). Já as 1CysPrxs, possuem apenas a cisteína N-terminal conservada e o ácido sulfênico gerado é estabilizado e reduzido por um grupo tiol exógeno, como DTT ou ascorbato (MONTEIRO *et al.*, 2008). Já nas PRXs atípicas, ácido sulfênico é estabilizado pela formação de uma ponte dissulfeto intramolecular com uma segunda cisteína na porção C-terminal (DIETZ, 2011).

---

Em plantas, é relevante o papel das PRXs, assim como de CATs e APXs, na transdução de sinal durante o desenvolvimento celular, pois atuam na regulação do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual, por sua vez, controla a transcrição gênica e sinalização celular por meio de cascatas de fosforilação (FINKEMEIER *et al.*, 2005). Essa função das PRXs é bem evidente em diversos processos celulares. Por exemplo, as 1CysPrxs atuam durante a dormência de sementes, dessecação e retomada do desenvolvimento após reidratação e respiração, protegendo contra efeitos deletérios das EROs (HASLEKAS *et al.*, 2003). Esse efeito protetor das PRXs também é observado quando plantas de *A. thaliana* são tratadas com peróxido de hidrogênio exógeno, quando observa-se aumento de expressão de transcritos de 2CysPrx (HORLING *et al.*, 2003). Plantas de *A. thaliana*, sob condições de déficit de água, mostraram aumento dos níveis de transcritos de PrxIIB, sugerindo função importante desse gene nessas condições (GAMA *et al.*, 2008). Já a exposição à alta e baixa intensidade luminosa, bem como deficiência nutricional de fósforo, induziram aumento dos transcritos de PrxIIC e PrxIID (HORLING *et al.*, 2003; KANDBINDER *et al.*, 2004). Já está bem estabelecido que outro grupo de PRXs, 2CysPrx, está envolvido na proteção do aparato fotossintético. 2CysPrxs são transcritas no núcleo e posteriormente, traduzidas no citoplasma e endereçadas ao cloroplastos, onde estão associadas à membrana do tilacoíde (GENOT *et al.*, 2001). Essa função de proteção oxidativa fica bem evidente, como demonstrado em plantas de *A. thaliana* com genes para expressão da 2CysPrxA e 2CysPrxB nocauteados. Como respostas desse silenciamento, ocorreu deficiência de crescimento nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, alteração fenotípica, clorose, além de carbonilação de proteínas e severo estresse oxidativo, indicando a extrema importância dessas proteínas (BAIER *et al.*, 2000).

Diversos estudos mostraram que o estado estrutural e funcional de 2CysPrxs típicas pode se alterar em resposta à severidade do estresse oxidativo. 2CysPrxs podem



---

adotar conformação de alta massa molecular e funcionar como chaperonas, protegendo proteínas da desnaturação. Esses achados foram primeiramente descritos por JANG *et al.* (2004), que descreveram a função chaperona para as 2CysPrxs, cPrxI e PrxII em leveduras. Essa atuação como chaperona também foi confirmada em *Brassica napus* (ARAN *et al.*, 2008), *Brassica rapa* (KIM *et al.*, 2009) e *Arabidopsis thaliana* (MUTHURAMALINGAM *et al.*, 2009). Em sua estrutura, as 2CysPrxs contêm motivos característicos como FFYPLDFTFVCPTEI, o motivo EVCP, próximo a cisteína peroxidásica, e os domínios GGLG e YF, que estão envolvidos na sensibilidade à hiperoxidação (WOOD *et al.*, 2003). As 2CysPrxs, quando na forma de homodímeros, funcionam como unidade catalítica elementar. Entretanto, todos os homodímeros de 2CysPrx, dependendo do estado redox e do estresse oxidativo, apresentam alta propensão em mudar sua estrutura para decâmeros, gerando complexos de alta massa molecular (KIM *et al.*, 2009). De forma ainda não esclarecida, os domínios GGLG e YF funcionam como sensores redoxes, retardando a formação das pontes dissulfeto e aumentando a possibilidade de hiperoxidação (FLOHÉ *et al.*, 2002). Essas observações apoiam fortemente a hipótese de que a hiperoxidação de 2CysPrxs está envolvida na sinalização redox dependente de EROs, sob condições de estresse oxidativo. Nesse contexto, diversos estudos têm mostrado que mudança de estado estrutural de 2CysPrxs eucarióticas, e sua decorrente função como chaperona, estão associadas à sensibilidade à hiperoxidação dos domínios GGLG e YF, que estão envolvidos na indução da oligomerização (WOOD *et al.*, 2003). Outras condições, como a baixa concentração de ATP, também são capazes de induzir auto-polimerização de 2CysPrxs em decâmeros (FERRO *et al.*, 2012).

Em relação a estresses bióticos, poucos trabalhos relatam a função de PRXs quando as plantas estão sob essas condições. Rouhier *et al.*, (2004) observaram aumento de transcritos de *Prx Q* e *Prx II* na interação compatível entre *Populus sp.* e o fungo *Melampsora larici-Populina*, 24 horas após a infecção. Em outro estudo, uma *Prx Q* purificada de *Gentiana*

---

*triflora* apresentou atividade fungicida contra *Alternaria alternata* e o respectivo transcrito aumentou, após indução com ácido salicílico (KIBA *et al.*, 2005). Mais recentemente, Moura *et al.*, (2014), em estudos proteômicos demonstraram aumento de expressão de PrxIIIE, 24 e 48 horas após infecção do feijão-de-corda, genótipo BR3, com o fungo *C. gloeosporioides*, reforçando a hipótese de participação ativa dessas proteínas na relação incompatível entre esses dois organismos.

## **2.5 Mecanismos moleculares da interação entre feijão-de-corda e *C. gloeosporioides***

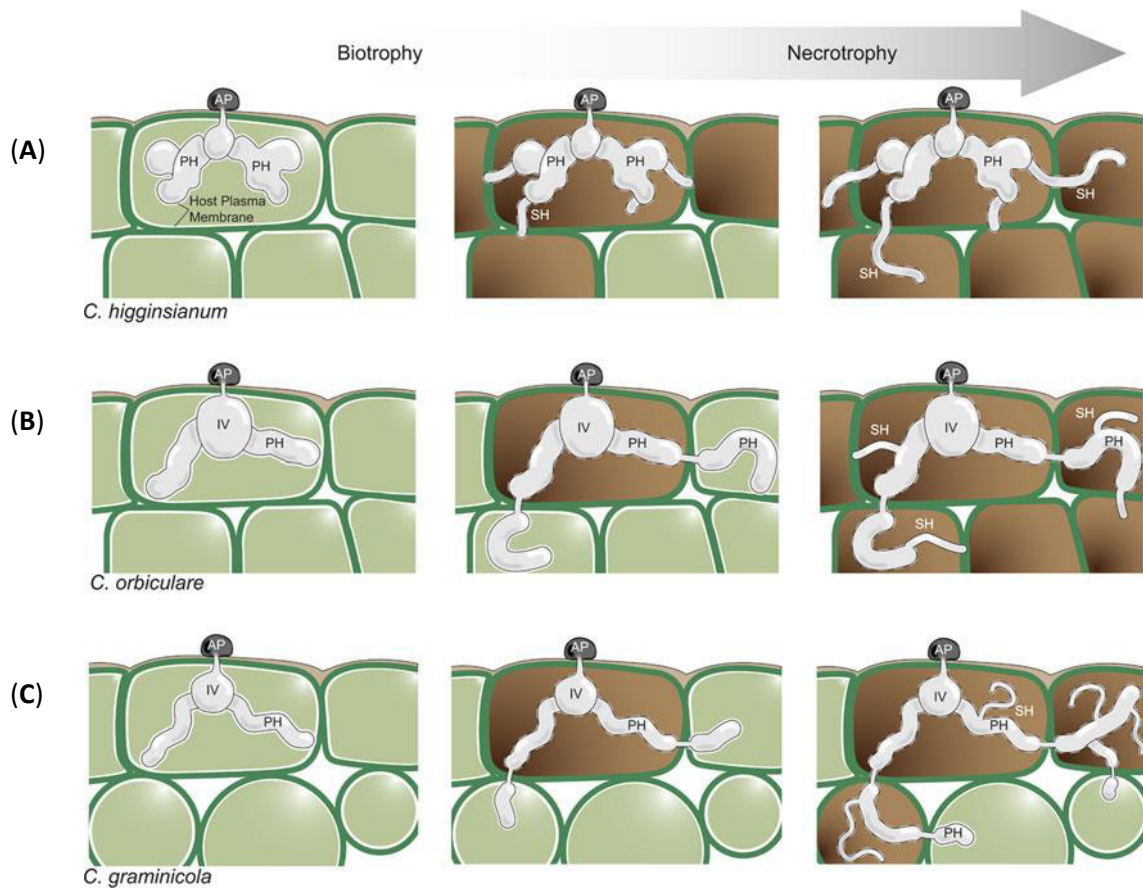
Apesar das características genéticas que conferem boa adaptação às condições climáticas adversas, a produtividade do feijão-de-corda é comprometida devido a problemas de natureza biótica como o ataque de bactérias e insetos, destacando-se os vírus, fungos e nematoídes como os que mais prejudicam sua produtividade (ADEGBITE; AMUSA, 2008; ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2000; BARRETO *et al.*, 2007). Os fungos do gênero *Colletrotichum*, causam a Antracnose, doença causada por mais de 100 espécies desse gênero e afetam muitas culturas no mundo, seja para produção de alimentos, fibras ou forragens (HYDE *et al.*, 2009). Devido à sua importância econômica e substancial capacidade de destruição, os fungos do gênero *Colletrotichum* têm recebido especial atenção. Durante o processo de infecção do hospedeiro, esses fungos empregam um vasto arsenal de estratégias nutricionais e estilos de vida variados, podendo atuar como organismos hemibiotróficos, necrotróficos ou mesmo desempenhar estratégias endofíticas (MÜNCH *et al.*, 2008). Entretanto, para a maioria das espécies de *Colletrotichum* de interesse agrônomo, as estratégias de infecção empregadas nos passos iniciais são muito similares. Os conídios aderem à superfície da planta hospedeira onde germinam, formando um curto tubo

---

germinativo que se diferencia em um apressório que adere à cutícula na superfície da planta hospedeira (PERFECT *et al.*, 1999). Uma vez aderido, o apressório se diferencia tornando-se melanizado e secreta um conjunto de enzimas dentre as quais pectinases e enzimas hidrolíticas que são fundamentais na aderência, sinalização e enfraquecimento da parede celular hospedeira (O'CONNELL *et al.*, 2004). A partir do apressório, emerge um tubo de penetração que penetra na cutícula e desenvolve uma hifa primária intracelular (MENDGEN; HAHN, 2002). Essa primeira etapa é definida como a fase biotrófica intracelular e pode variar dependendo de cada espécie de *Colletotrichum*. Na espécie *C. higginsianum*, a hifa primária intracelular, gerada na fase biotrófica, coloniza somente uma única célula hospedeira para, posteriormente, mudar para fase necrotrófica. Já em *C. orbiculare* a hifa primária intracelular gerada na fase biotrófica coloniza múltiplas células para, em seguida, gerar a hifa secundária e matar a célula hospedeira ao redor do sitio de infecção. Em *C. graminicola*, a hifa primária intracelular coloniza múltiplas células hospedeiras e as duas fases biotrófica e necrotrófica, coexistem durante a infecção (CROUCH *et al.*, 2014). Durante fase biotrófica da infecção, ocorre aumento na transcrição de genes que auxiliam no processo de infecção. Genes do fungo denominados de CAZymes (*Genes Encoding Carbohydrate-Active Enzymes*) codificam enzimas que degradam estruturas como cutina, celulose, hemicelulose e pectina. Ao mesmo tempo, ocorre a expressão de genes (CSEP-encoding genes) do fungo que codificam efetores candidatos (*CSEP = candidate secreted effectors*) e genes associados aos eventos de remodelagem da parede celular, que contribuem para a penetração inicial, estabelecimento das hifas primárias e modulação da célula hospedeira (O'CONNELL *et al.*, 2012). Em *C. higginsianum*, o processo de infecção segue e em poucos dias hifas secundárias mais estreitas são geradas, seguido de reprogramação gênica e passagem da fase biotrófica intracelular para a fase necrotrófica destrutiva que é caracterizada por um processo de alcalinização do meio, expressão de genes que codificam proteases, expressão de enzimas envolvidas com

---

degradação de polissacarídeos (CAZymes), permeases e transportadores de membrana plasmática levando a degradação das células do hospedeiro e necrose, sintomas característicos da fase necrotrófica (O'CONNELL *et al.*, 2012). O mecanismo de infecção intracelular hemibiotrófico adotado por espécies do gênero *Colletotrichum* encontra-se na **fig. 1**. Diferente, outras espécies de *Colletotrichum* como *C. circinans* e *C. capsici* adotam estratégias de infecção exclusivamente necrotrófica. Após penetração na cutícula esses patógenos desenvolvem dentro das paredes periclinais e anticlinais das células epidérmicas, utilizando estratégia de infecção subcuticular intramural necrotrófica. Esse desenvolvimento está associado ao intumescimento e dissolução da parede celular hospedeira, podendo ocorrer uma fase biotrófica curta ou apenas uma fase necrotrófica. Posteriormente, o fungo continua a crescer intramuralmente, penetrando na célula apenas posteriormente (AKINWUNMI e LATUNDE-DATA 2001; PRUSKY *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Mecanismo de infecção intracelular hemibiotrófica adotada por espécies do gênero *Colletotrichum*. **(A)**: hifas primárias de *C. higginsianum* colonizam somente uma célula epidérmica, para em seguida, modificar o estilo de vida para fase necrotrófica gerando hifas secundárias e induzindo morte celular nas células hospedeiras. **(B)**: durante a fase biotrófica, hifas primárias de *C. orbiculare* colonizam múltiplas células hospedeiras, para em seguida, mudar para fase necrotrófica com hifas secundárias colonizando múltiplas células hospedeiras. **(C)**: durante a fase biotrófica, hifas primárias de *C. graminicola* colonizam múltiplas células hospedeiras como demonstrado em *C. orbiculare*, contudo a fase biotrófica persiste em conjunto com a fase necrotrófica. AP: apressório; IV: vesícula de infecção; PH: hifa primária; SH: hifa secundária. (Adaptado de: CROUCH *et al.*, 2014).

---

Fungos do gênero *Colletotrichum* atacam diversas culturas de importância econômica para o Brasil, destacando-se o feijão-de-corda. Atualmente, o controle desse patógeno sobre culturas de feijão se dá por meio do uso de fungicidas e do uso de cultivares resistentes. Assim, o conhecimento dos mecanismos de defesa dos cultivares e genótipos resistentes torna-se uma estratégia interessante na busca de novos meios de controle da doença. Dessa forma, a compreensão dos mecanismos de defesa do feijão-de-corda é fundamental para entendimento da natureza da resistência. Bailey, Nash e O'Connell, (1990), demonstraram que *C. lindemuthianum* foi capaz de induzir uma rápida resposta de hipersensibilidade em plantas de feijão. Esse processo de infecção segue com a extensiva colonização da superfície das células com formação de tubos germinativos, conidióforos e apressórios melanizados podendo o processo de infecção se dar de modo direto ou indireto através dos estômatos (LATUNDE-DADA *et al.*, 1996; LATUNDE-DADA *et al.*, 1999). Já Barreto *et al.*, (2007), demonstraram que a resistência do genótipo de feijão-de-corda TE97-411-1E à infecção pelo *C. gloeosporioides* estava associado ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> epidérmico, aumento da atividade da enzima fenilalanina amônia-ase, produção de compostos fenólicos e lignificação de parede celular. Posteriormente, foi observado que outros mecanismos de defesa como a indução de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), entre as quais, peroxidases, glucanases e chitinases demonstram-se envolvidas nesse mecanismo (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Moura *et al.*, (2014) trabalhando com o genótipo BR 3 de feijão-de-corda resistente a linhagem de *C. gloeosporioides* (LPVD-1) demonstraram que, após infecção, ocorre um rápido reconhecimento e modulação de processos celulares importantes como reprogramação de proteínas do aparato fotossintético, metabolismo energético e em destaque, o aumento de expressão de enzimas anti-oxidantes como dismutase do superóxido (*CuZn-SOD*), peroxidase do ascorbato (*APX*), peroxidases (*POX*), peroxirredoxinas IIE (*PrxIIE*) e tiorredoxinas (*TRX*). Dessa forma, eventos de resposta de defesa como a explosão

oxidativa, produção de EROs e aumento de expressão de enzimas antioxidantes demonstram-se eventos importantes na resistência do feijão-de-corda *V. unguiculata* genótipo BR 3 ao *C. gloeosporioides* isolado (LPVD-1). Apesar desse conhecimento, há muito trabalho a ser realizado para compreender de fato, as estratégias de defesa do feijão-de-corda contra *C. gloeosporioides*.

---

### 3. JUSTIFICATIVA

O feijão-de-corda destaca-se como uma das mais importantes culturas cultivadas no Brasil, em especial na região Nordeste. Apesar do aumento da sua produtividade e das variadas estratégias utilizadas no controle de patógenos, o desenvolvimento desse cultivar é prejudicado em decorrência de estresses bióticos, entre as quais as infecções causadas por fungos. Dentre as infecções causadas por fungos, a Antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, destaca-se como um importante patossistema que compromete a produtividade de diversas culturas. Pesquisas envolvendo o estudo das interações entre feijão-de-corda x *C. gloeosporioides* demonstram que a resistência está associada com eventos que envolvem a HR, acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fase inicial da infecção além do aumento de expressão de enzimas envolvidas no metabolismo qantioxidante (BARRETO *et. al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2014).

O entendimento dos mecanismos de defesa de genótipos resistentes de feijão-de-corda ao *C. gloeosporioides* através da compreensão das respostas bioquímicas, análise de expressão de genes alvo, associando a cinética de desenvolvimento de *C.gloeosporioides*, contribui para a compreensão do conhecimento sobre os mecanismos básicos de resistência que poderão auxiliar o desenvolvimento de novos cultivares resistentes, através do uso de ferramentas moleculares. além de funcionar como conhecimento base para estudo de fungos hemibiotróficos.

Nessa perspectiva, o presente trabalho investigou os possíveis mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na resistência do genótipo BR3, em decorrência da inoculação com *C. gloeosporioides*, analisando as respostas bioquímicas associadas à HR, e análise de expressão de genes alvo.



# CAPÍTULO I

Anotação e Caracterização da Família Multigênica de  
Peroxirredoxinas de feijão-de-corda *Vigna unguiculata*  
[(L.) Walp.]

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivos geral

Anotar, analisar filogeneticamente e avaliar a expressão da família multigênica de peroxirredoxinas (PRXs) em folhas de feijão-de-corda, genótipo BR-3, Tracuateua;

### 1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a família multigênica das PRXs de feijão-de-corda e comparar genes de peroxirredoxinas de outras espécies de planta (*Phaseolus vulgaris*, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*) já anotados, por meio de buscas em bancos de dados e análise de sequências;
- Verificar a relação evolutiva da família multigênica das PRXs de feijão-de-corda com PRXs de outros grupos de plantas e construir uma árvore filogenética, por meio da análise de dados de sequenciamento molecular;
- Avaliar a expressão gênica da família multigênica das PRXs em folhas de feijão-de-corda, genótipo BR-3, bem como definir condições ótimas de temperatura de reação por PCR convencional e PCR quantitativa (RT-qPCR);

---

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A extração de RNA total foi realizada com auxílio de reagente comercial (*RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini kit*) e os RNAs extraídos tratados com DNase livre de RNase, todos obtidos da Qiagen (Alemanha). Nas reações de transcrição reversa (RT-PCR), foi utilizado o reagente *ImPromII<sup>™</sup> Reverse Transcription System* obtido da Promega (USA). O *Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix* (1x concentrado) foi usado nas reações de qPCR, sendo adquirido da Applied Biosystems (USA). A síntese dos oligonucleotídeos específicos foi realizada pela Integrated DNA Technologies (ITD) San Diego (USA).

### 2.2 Métodos Experimentais

#### 2.2.1 Anotação dos genes de peroxirredoxinas (*PRXs*) de feijão-de-corda

Para anotação dos genes de peroxirredoxinas de feijão-de-corda foram utilizadas “sequências iscas” de DNA complementar (cDNA) de *PRXs* de organismos modelos (**Tab. 1**) (*Medicago truncatula* e *Arabidopsis thaliana*), depositadas no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Em plantas, são descritas quatro isoformas de *PRXs*: 1CysPrx, 2CysPrx, PrxQ e Prx tipo II distribuídas no núcleo, cloroplasto, mitocôndria e citosol (DIETZ *et al.*, 2006). Como não havia o genoma disponível para *V. unguiculata*, partimos inicialmente para anotação dos genes em *P. vulgaris*, uma espécie muito próxima filogeneticamente ao *V. unguiculata*. Dessa forma, as “sequências iscas” de cDNA foram utilizadas para busca de regiões complementares no genoma de *Phaseolus vulgaris* depositado no banco de dados do

Phytozome V 9.1 ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)). As regiões das sequências de *P. vulgaris* com alta identidade foram selecionadas no formato *fasta.txt* para anotação das regiões referentes aos éxons. A partir das sequências *fasta.txt*, as sequências de cDNA foram deduzidas com auxílio da ferramenta *Expasy translated tool* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Baseado nas sequências deduzidas de cDNA de cada isoforma de PRXs de *P. vulgaris*, foi realizada nova busca no NCBI nas etiquetas de sequências expressas (ESTs = *Expressed Sequences Tags*) de *V. unguiculata* (taxid:3917), usando a ferramenta *tblastx*. Os ESTs de *Vigna unguiculata* gerados a partir do resultado da busca e que mostraram alta identidade foram selecionados e os cDNAs completo montados com auxílio da ferramenta CAP3 (HUANG; MANDAN, 1999). As sequências de cDNA de cada isoforma de PRX de *Vigna unguiculata* foram analisadas e utilizadas para análise filogenética e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos.

**Tabela 1.** Sequências iscas de cDNA de PRXs usadas para anotação de genes de *V. unguiculata*

Abreviação do Gene	Gene	Número de acesso	Organismo	Localização celular
<b>1CysPrx</b>	1-Cis Peroxirredoxina	XM_003635807	<i>M. truncatula</i>	Núcleo/Citosol
<b>2CysPrx</b>	2-Cis Peroxirredoxina	AY594329.1	<i>M. truncatula</i>	cloroplasto
<b>PrxQ</b>	Peroxirredoxina Q	AY594329.1	<i>M. truncatula</i>	cloroplasto
<b>Prx IIB</b>	Peroxirredoxina tipo II	NM_001036162.1	<i>A. thaliana</i>	Citosol
<b>Prx IIC</b>	Peroxirredoxina tipo II	NM_105269.4	<i>A. thaliana</i>	Citosol
<b>PrxIID</b>	Peroxirredoxina tipo II	NM_104757.3	<i>A. thaliana</i>	Citosol
<b>PrxIIE</b>	Peroxirredoxina tipo II	NM_115156.2	<i>A. thaliana</i>	Cloroplasto
<b>Prx IIF</b>	Peroxirredoxina tipo II	NM_111480.3	<i>A. thaliana</i>	Mitocondria

---

Fonte: NCBI - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

### **2.2.2 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos de peroxirredoxinas de *V. unguiculata***

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos utilizados na PCR convencional e PCR quantitativa em tempo real foram desenhados usando o programa *Perl primer* V1.1.20 (MARSHALL, 2011). Esses iniciadores foram desenhados nas junções éxon-éxon nos genes anotados da *Vu1CysPrx*, *VuPrxQ*, *VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*. Devido a similaridades e critérios utilizados pelo programa *Perl primer*, os genes da *Vu2CysprxA* e *Vu2CysprxB* foram desenhados a partir da região 3' não traduzida (3'UTR) e os genes da *VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII* de outras regiões do cDNA. A escolha das regiões foi realizada com base na região de menor conservação entre as sequências de nucleotídeos. Os iniciadores desenhados variaram em comprimento de 19 a 25 pares de bases (pb), com temperatura de anelamento entre 57,5 a 63,6 °C, e tamanho do fragmento a ser amplificado entre 104 a 204 pb.

### **2.2.3 Alinhamento das sequências de aminoácidos das PRX deduzidas a partir dos cDNA e análise filogenética das seqências de cDNA**

Após anotação dos genes das PRXs de *V. unguiculata*, sucedeu-se ao alinhamento e análise filogenética dos cDNAs anotados, bem como caracterização das sequências primárias de aminoácidos das proteínas deduzidas a partir do cDNA de cada PRX de *V. unguiculata*. As sequências foram obtidas com uso da ferramenta *ExpASy Translate tool* ([web.expasy.org/translate/](http://web.expasy.org/translate/)). As sequências de cDNA de *V. unguiculata*, juntamente com as sequências de cDNA de *P. vulgaris*, *A. thaliana* e *O. sativa*, espécies pertencentes à ordem

---

Fabales, Brassicales e Poales, respectivamente, foram alinhadas usando o programa *ClustalW2* ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)). A relação evolutiva foi determinada pelo programa MEGA 6.0 empregando o método da junção sucessiva de dois nós vizinhos (*neighbor-joining method*) (SAITOU e NEI, 1987), com índice de confiabilidade (*bootstrap*) com 1.000 repetições (TAKAMURA *et al.*, 2013).

#### **2.2.4 Viabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs por PCR convencional**

Após desenho e síntese dos oligonucleotídeos iniciadores específicos, os testes iniciais utilizando cDNA do feijão-de-corda, genótipo BR-3, para verificação da viabilidade dos oligos desenhados, foram conduzidos. No experimento teste com iniciadores das PRXs, cDNAs obtidos a partir dos RNAs extraídos de folhas do genótipo de feijão-de-corda BR-3 foram usados. Para o gene da *VuICysPrx*, além do cDNA de folhas, cDNAs obtidos a partir de RNAs de vagens em desenvolvimento foram utilizados. Para extração de RNA total, folhas primárias de plantas com 15 dias após a semeadura e vagens em desenvolvimento, com 45 dias, após floração foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. A partir de 100 mg de massa do material vegetal macerado a extração de RNA total, com auxílio do Kit *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen Alemanha), foi realizada, de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs extraídos foram quantificados por espectrofotômetro tipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) e avaliados quanto à integridade e pureza por eletroforese em gel de agarose. Esses RNAs foram utilizados nas reações de transcrição reversa (RT-PCR) e síntese do DNA complementar (cDNA), a partir de 1 µg de material, com auxílio do Kit *IMpromII<sup>TM</sup> Transcriptase Reversa* (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR convencional foram

---

conduzidas usando 150 ng de cada cDNA obtido e os oito pares de iniciadores específicos foram analisados segundo as condições de reação: 2 µL de *GoTaq Buffer* 5x concentrado; 1 µL de cada iniciador (0,3 mM); 0,1 µL de DNTp (10 mM); 0,1 µL de *GoTaq® DNA polimerase* (1 unidade de atividade/µL); e água grau Milli-Q, contabilizando um volume final de reação de 10 µL. A temperatura ótima de anelamento estimada para cada iniciador foi obtida usando reações com gradiente de temperatura em termociclador Techne® Endurance TC-512 (Techne, Franca), e utilizando condições de anelamento com variadas temperaturas (50,7, 52,1, 55,5, 57,4 e 59,9 °C). A reação de PCR foi conduzida segundo os parâmetros a seguir: 3 min a 94 °C para ativação da enzima taq DNA polimerase, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s; anelamento entre 47 °C a 65 °C por 25 s; e extensão a 60 °C por 30 s. Os resultados das reações foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) fundido em solução tampão TBE (5x concentrado), constituído de tris 1,1 M, pH 8,3, ácido bórico 900 mM e EDTA 25 mM. Após a corrida, o gel foi colocado em contato com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL), durante 10 min, sob agitação constante, e o resultado fotodocumentado por meio do sistema *Mini BIS Pro* (Bio-Imaging Systems, Israel), com auxílio do programa *GelCapture™*.

---

### 2.2.5 Viabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs por RT-qPCR

Além da análise dos oligo iniciadores específicos por PCR convencional, eles, também, foram testados por PCR em tempo real (RT-qPCR) para determinação da temperatura média de anelamento ( $T_m$ ) de cada iniciador e verificar ausência de amplificação de produtos inespecíficos. Para análise, 150  $\mu\text{g}$  de cada cDNA obtido foram usados nas seguintes condições: 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (0,3 mM); 6  $\mu\text{L}$  de cDNA (25  $\mu\text{g}$ ); 10  $\mu\text{L}$  de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (1x concentrado); e 2  $\mu\text{L}$  de água grau Milli-Q, em um volume final de reação de 20  $\mu\text{L}$ . A  $T_m$  para cada par de iniciador foi obtida usando reações com gradiente de temperatura de 47 to 65  $^{\circ}\text{C}$ , sendo escolhidas as seguintes temperaturas para os testes: 50,5, 52,7, 55,0, 57,5, 59,8 61,9, 63,6 e 65,0 $^{\circ}\text{C}$ . As reações de RT-qPCR foram conduzidas usando os seguintes parâmetros: 10 min a 94  $^{\circ}\text{C}$  para ativação da enzima; 40 ciclos de desnaturação a 94  $^{\circ}\text{C}$  por 15 s; anelamento 50,5  $^{\circ}\text{C}$  a 65,0  $^{\circ}\text{C}$  por 15 s; e extensão a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 20 s. Após amplificação, uma curva de fusão foi obtida onde a fluorescência (F) foi representada graficamente em função da temperatura (T) mantendo a 94  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 s e depois a 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 s, seguido por aquecimento lento a 0,03  $\text{s}^{-1}$  até 94  $^{\circ}\text{C}$ . Os dados da curva de fusão e quantificação foram exportados e analisados.



---

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Anotação dos genes de peroxirredoxinas (PRXs) de feijão-de-corda e análise das sequências de aminoácidos

Famílias multigênicas codificam as várias isoformas de PRXs nas espécies *A. thaliana*, *P. vulgaris* e *O. sativa*, cujos genomas encontram-se sequenciados e disponíveis nos bancos de dados (Phytozome). Por meio de busca das “sequências iscas” de *M. truncatula* e *A. thaliana* no genoma de *P. vulgaris*, no banco de dados Phytozome, foi possível deduzir e anotar, baseado em etiquetas de sequências expressas (*expressed sequence tags* - EST) de *V. unguiculata*, depositadas no NCBI, oito genes de PRXs de feijão-de-corda: *Vu1Cysprx*; *Vu2CysprxA*; *Vu2CysprxB*; *VuPrxQ*; *VuPrxIIBCD*; *VuPrxIIE*; *VuPrxIIFI*; e *VuPrxIIFII*. Os respectivos cDNAs anotados apresentaram tamanhos entre 312 a 810 pares de bases, com identidade entre as sequências, variando entre 48,28% para os pares de genes *Vu1Cysprx/VuPrxIIE* e 90,83% para os pares de genes *Vu2CysprxA/Vu2CysprxB*. A partir das sequências dos cDNAs, foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores específicos. Além disso, foram obtidos outros dados importantes como tamanho do amplicon e temperatura de anelamento, definidos a partir do programa *Perl primer* (**Tab. 2**).

**Tabela 2:** Sequência dos iniciadores de PRXs de *V. unguiculata*, tamanho do amplicon, número de acesso e temperatura de fusão definidos pelo programa *Perl primer*

Gene	Produto Gênico	Sequência do primers (5' → 3')	cDNA (pb)	Produto (pb)	Número de Acesso	Temperatura ótima de anelamento experimental (Ta °C)
<b>Vu1CysPrx</b>	1-Cis-peroxirredoxina	Fwd TGAAGCCTACATTTTCAGGTTG Rev AGTCTTTCTCTTCAGGGTCA	810	104	GH619145.1	59,8
<b>Vu2CysPrxA</b>	2-Cis-peroxirredoxina A	Fwd AATTGCTCATCTGTATCAGTC Rev GTTCCATACATCATAAACCGT	780	162	JF438998.1	57,5
<b>Vu2CysPrxB</b>	2-Cis-peroxirredoxina B	Fwd GCTCATCTGTATCAATTAATGGTG Rev GCACGCACAATCATTAGATAAG	786	112	JF438998.1	57,5
<b>VuPrxQ</b>	Peroxirredoxina Q	Fwd CAAAGCCACCGAATTCACAC Rev AAGCACAAGCCTGTTTGTA	639	135	FF553671.1	61,9
<b>VuPrxIIBCD</b>	Peroxirredoxina IIBCD	Fwd TGTATCAGTGTGAATGACCC Rev TAACACCAAGACCTTTCTCTG	486	151	FG911988.1	57,5
<b>VuPrxIIE</b>	Peroxirredoxina IIE	Fwd CTCATCTCTTCTACCACCGT Rev CGTCTTCACCTCTCCATCTG	648	204	FG869427.1	59,8
<b>VuPrxIIFI</b>	Peroxirredoxina IIFI	Fwd ATGGTGAATCGAGGTGGTTG Rev GTCTTTGAGAGGAGTGGTGG	591	183	FG937809.1	57,5
<b>VuPrxIIFII</b>	Peroxirredoxina IIFII	Fwd TAAGGCTAAGAGGGTCGATTT Rev CAAACTTCTATGAAAGCTCCCA	312	139	XM_0035415762	59,8

---

A partir das sequências dos cDNAs, foi possível deduzir as sequências de aminoácidos de cada uma das PRXs de feijão-de-corda que, em seguida, foram alinhadas com auxílio do programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). O resultado é apresentado na **Fig. 1**. A análise das sequências permitiu identificar, o resíduo de cisteína (Cys) do sítio ativo, conservado na porção N-terminal, também denominado de cisteína peroxidásica (Cys<sub>P</sub>), e envolvido no mecanismo catalítico de peroxirredoxinas. A sequência da isoforma Vu1CysPrx apresentou 218 aminoácidos e apenas um resíduo de cisteína, enquanto que as sequências das isoformas Vu2CysPrxA e Vu2CysPrxB apresentaram 262 e 260 aminoácidos, respectivamente (**Fig. 1**). Nessas sequências, duas outras cisteínas foram observadas, sendo uma na porção N-terminal e outra na região C-terminal. Em ambas as isoformas das 2CysPrx, também foram observados os domínios FFYPLDFTFVCPT, ao redor da cisteína peroxidásica, (Cys<sub>P</sub>), o motivo EVCP na cisteína de resolução (Cys<sub>R</sub>) e os motivos GGLG, e YF encontrados nas 2CysPrx eucarióticas. A VuPrxQ apresentou 213 resíduos de aminoácidos e as duas cisteínas (Cys<sub>P</sub><sup>108</sup> e Cys<sub>R</sub><sup>113</sup>) envolvidas no mecanismo catalítico, separadas por apenas 4 aminoácidos. Nas isoformas de peroxirredoxinas tipo II, VuPrxIIBCD apresentou 162 aminoácidos, VuPrxIIE 216 aminoácidos e VuPrxIIFI 197 aminoácidos e VuPrxIIFII 119 aminoácidos. Os resíduos de cisteína peroxidásica (Cys<sub>P</sub>) e de resolução (Cys<sub>R</sub>) dessas isoformas foram espaçados por 24 aminoácidos (**Fig. 1**).



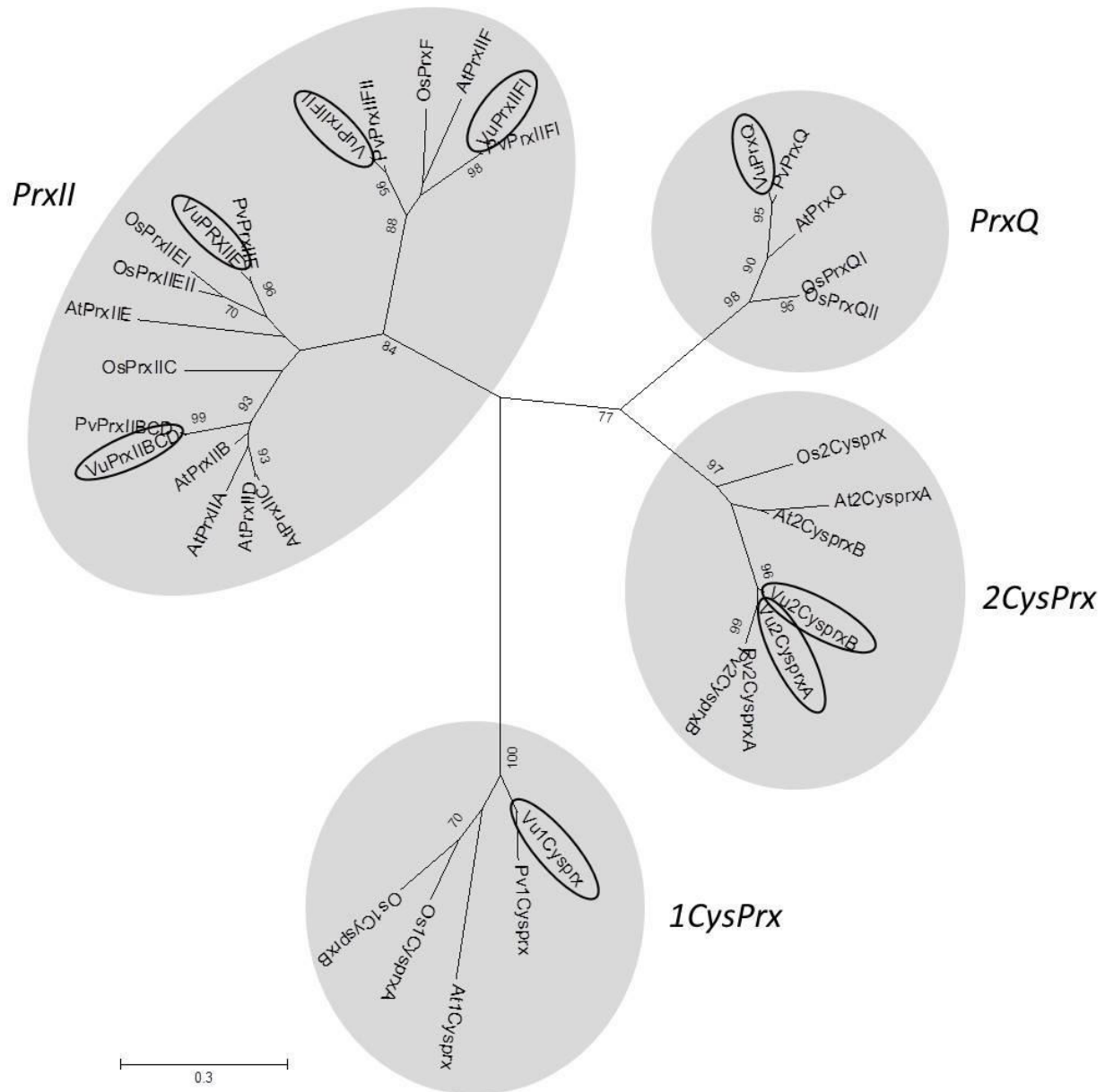
VuPrxIIE	DILDVL-----	216
AtPrxIIC	DILKAL-----	162
AtPrxIID	DILKAL-----	162
AtPrxIIB	DILKAL-----	162
VuPrxIIBCD	EIIKAL-----	162
VuPrxIIFI	TILGQI-----	197
VuPrxIIFII	TILEQI-----	119
AtPrxIIF	VILGQI-----	201
At1CysPrx	RALDSLMLMASKHNNKIATPVNWKPDQPVVISPAVSDEEAKMFPQGFKTADLPSKKGYL	211
Vu1CysPrx	RVIESLQKASQF--KVATPANWKPGEVVISPSVTNEQAKDMFPQGFDTVDLPSNKEYLR	214
At2CysPrxA	RTLQALQYIQENPDEVCPAG-WKPGEKSMKDPKLSKEYFSAI-----	266
At2CysPrxB	RTLQALQYVQENPDEVCPAG-WKPGEKSMKDPKLSKEYFSAI-----	273
Vu2CysPrxA	RTLQALQYVQENPDEVCPAG-WKPGEKSMKDPKLSKEYFSAI-----	262
Vu2CysPrxB	RTLQALQYVQENPDEVCPAG-WKPGEKSMKDPKLSKEYFSAI-----	260
VuPrxQ	KILQSL-----	213
AtPrxQ	KFLKAA-----	217
	: * Cys <sub>R</sub>	

**Figura 1.** Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos cDNAs das PRXs de *V. unguiculata*; (Vu) e *A. thaliana*; (At). O alinhamento foi realizado usando o programa *ClustalW2*. Em negrito, estão destacados os resíduos de cisteína peroxidásica (Cys<sub>P</sub>) e de cisteína de resolução (Cys<sub>R</sub>) envolvidas no mecanismo catalítico (DIETZ, 2011). Em cinza, estão destacados os domínios conservados das 2CysPrxs. Os números de acesso das sequencias de *A. thaliana* foram: At1CysPrx: NP\_175247.1; At2CysPrx: NP\_187769.1; At2CysPrxB: NP\_568166.1; AtPrxQ: NP\_001189979.1; AtPrxIIB: NP\_176773.1; AtPrxIIC: NP\_176772.1; AtPrxIID: NP\_564763.1; AtPrxIIE: NP\_190864.1; AtPrxIIF: NP\_566268.1.

---

### 3.2 Análise filogenética das sequências de cDNA de PRX

A relação filogenética dos genes das PRXs entre as espécies *V. unguiculata*, *P. vulgaris*, *O. sativa* e *A. thaliana* foi feita usando o programa Mega 6. A árvore filogenética gerada revelou quatro clados bem distintos (**Fig. 2**) entre as sequências dos diferentes cDNAs de PRXs das ordens Fabales, Poales e Brassicales. Uma grande diversificação foi encontrada para a subfamília das peroxirredoxinas tipo II (PrxII). Dentro da mesma subfamília das PrxII, o grupo das PrxIIF apresentou diferenças nas suas sequências, sendo agrupadas como um grupo diferente dentro do grande grupo das PrxII. As demais subfamílias, 1CysPrx, 2CysPrx e PrxQ, foram agrupadas próximas as sequências das PRXs de *P. vulgaris*, seguida das PRXs de *A. thaliana* e *O. sativa*.



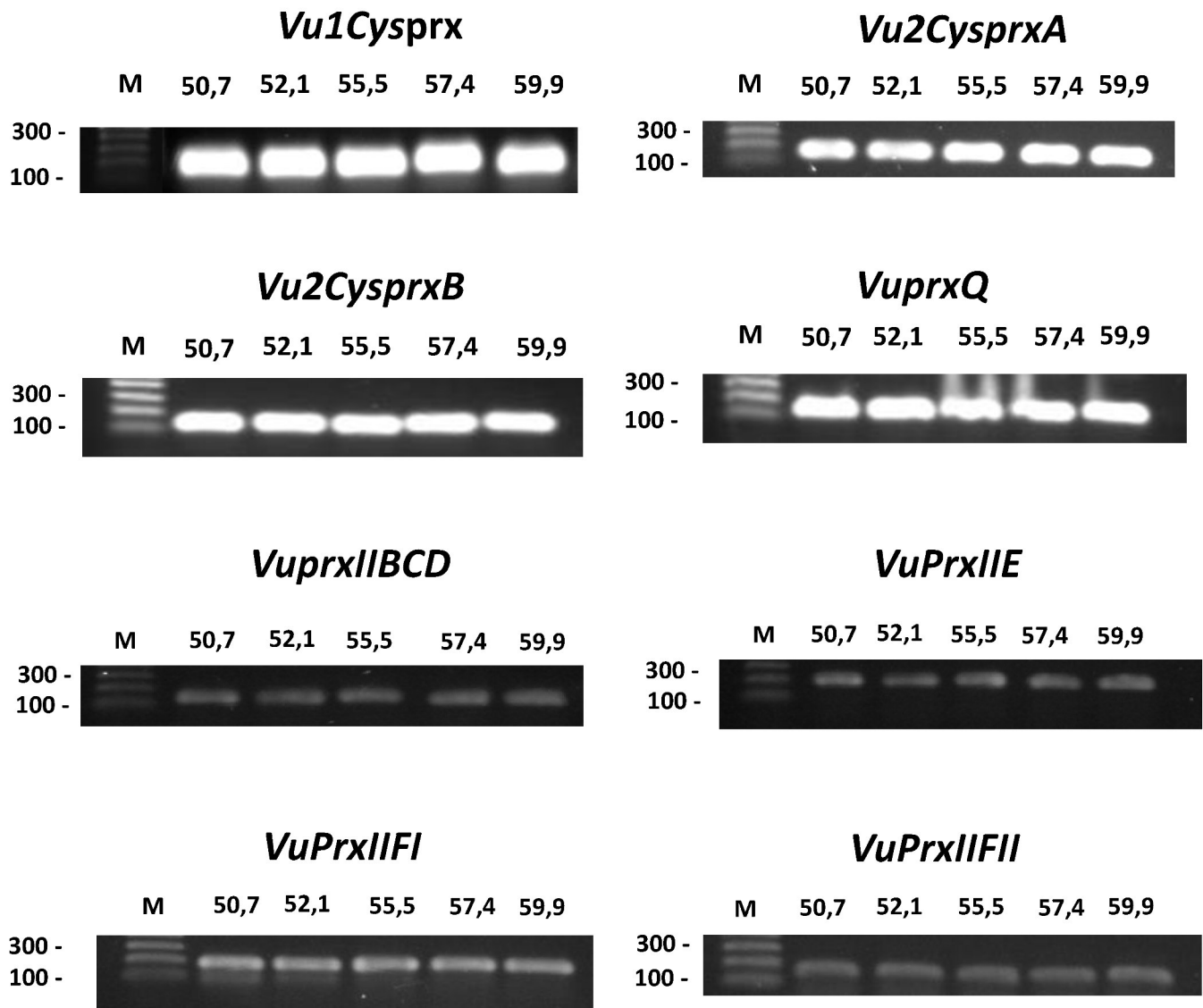
**Figure 2.** Árvore filogenéticas das seqüências de cDNAs de PRXs de *V. unguiculata* (Vu) e *P. vulgaris* (Pv), ambas pertencentes à ordem Fabales; *A. thaliana* (At) da ordem Brassicales; e *O. sativa* (Os) da ordem Poales. O programa MEGA 6 e o método da junção sucessiva de dois nós vizinhos (*neighbor-joining method*) foram usados, envolvendo 35 seqüências de nucleotídeos.

---

### 3.3 Viabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs por PCR convencional

Conforme os resultados das reações de PCR convencional em gradiente de temperatura feitas com os oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs, foi possível observar que, em todas as temperaturas, houve amplificação de um produto específico (**Fig. 3**). Todos os produtos amplificados apresentaram fragmentos de tamanho de 100-200 pb como esperado no desenho realizado no programa Perl primer (**Tab. 2**). Para o par de primer referente à *Vu1CysPrx* não foi observado amplificação de produto de PCR, quando foi utilizado cDNA de folha (dados não mostrados), sugerindo baixa ou nenhuma expressão do gene correspondente em folhas, nessa fase de desenvolvimento das plântulas (15 dias após semeadura). Contudo, utilizando cDNA oriundos de RNAs extraídos de vagens em desenvolvimento, houve êxito na amplificação de produtos em todas as temperaturas testadas, demonstrando a forte expressão e importância do gene da *Vu1CysPrx* nos estágios iniciais de formação das sementes. Os genes *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB* e *VuPrxQ* apresentaram expressão significativa em folhas quando comparadas com os demais genes de *PRXs*, (*VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*, *VuPrxIIFI*, *VuPrxIIFII*) (**Fig. 3**).



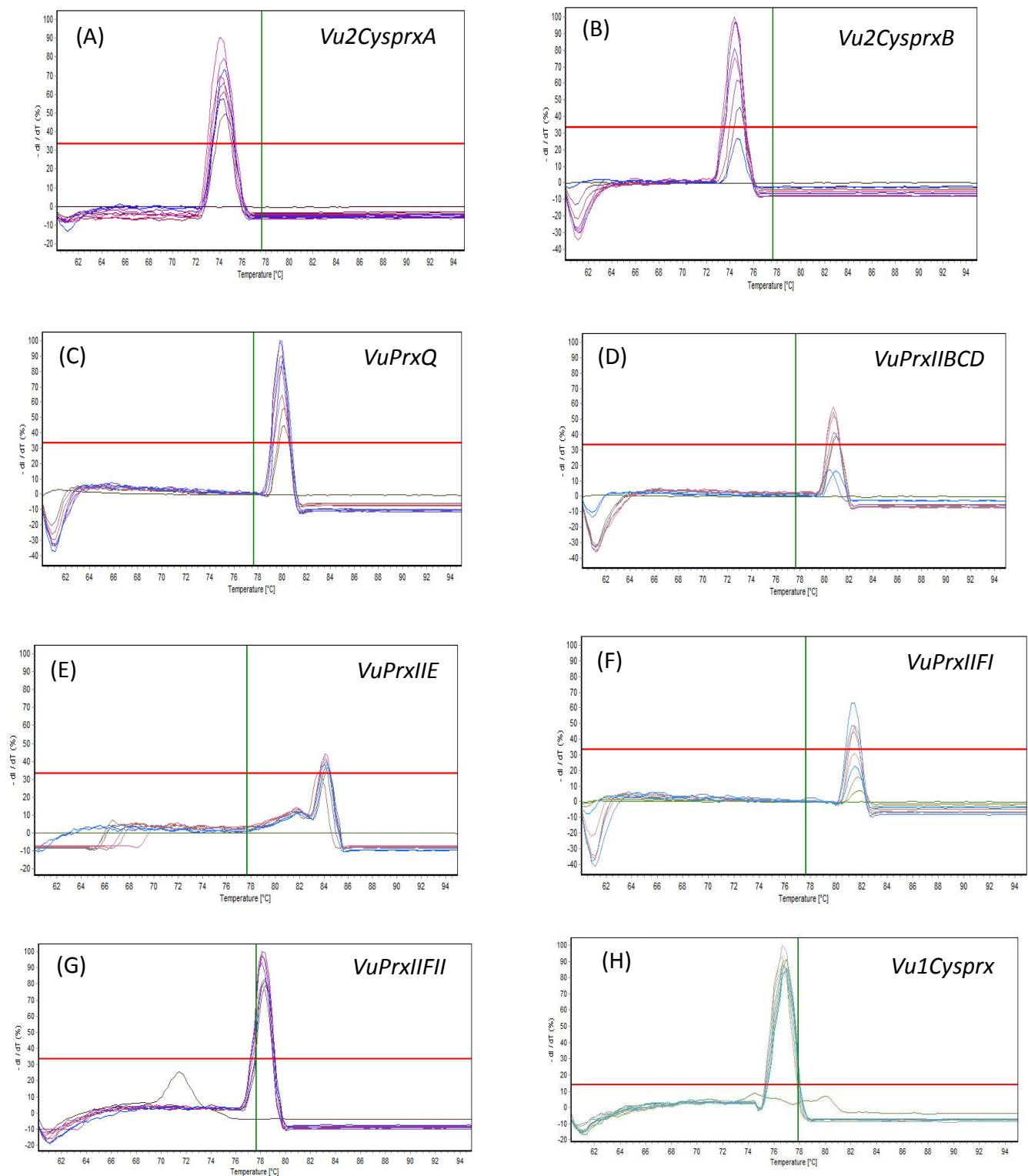


**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose (1%, v/v) dos produtos resultantes da reação de PCR em gradiente de temperatura, com oligonucleotídeos iniciadores específicos desenhados para os oito genes *Vu1Cysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuprxIIBCD*, *VuprxIIE*, *VuprxIIFI*, e *VuprxIIFII* de peroxidoredoxinas de *V. unguiculata*. Marcador: (M) em pares de bases. O gradiente de temperatura foi feito usando cinco temperaturas de anelamento escolhidas (50,7°C; 52,1°C; 55,5°C; 57,4°C; e 59,9°C) com base nas temperaturas teóricas dos oligonucleotídeos iniciadores obtidas na síntese. Na reação para o gene *Vu1Cysprx*, foi utilizado cDNA oriundo de vagens de sementes em desenvolvimento.

---

### 3.4 Análises dos oligonucleotídeos iniciadores específicos por RT-qPCR

Utilizando RT-qPCR, os oito oligonucleotídeos iniciadores desenhando especificamente para os genes correspondentes das PRXs de *V. unguiculata* foram testados a diferentes temperaturas. As curvas de dissociação geradas mostraram a presença de um único pico, evidenciando, desta forma, que um único produto foi amplificado e que não houve formação de dímeros de iniciadores (**Fig. 4**). Nos resultados da reação de PCR convencional em gradiente de temperatura, foi possível detectar um produto de PCR de forma fraca amplificado para *Vu1CysPrx*, quando utilizado cDNA de folha (dados não mostrados), sendo esses dados não suficientes, para avaliar a viabilidade do oligonucleotídeo iniciador. Contudo, utilizando cDNA oriundos de RNAs extraídos de vagens em desenvolvimento, houve êxito na amplificação de um único produto bem evidente, nas diversas temperaturas testadas (**Fig. 4H**). A temperatura de anelamento ótima usada para cada par de iniciador está mostrada na **Tab. 2**.



**Figura 4.** Curvas de dissociação obtidas por RT-qPCR usando iniciadores específicos para peroxidredoxinas. **A:** 2-Cis-peroxidredoxina A; **B:** 2-Cys-peroxidredoxina B; **C:** Peroxidredoxina Q; **D:** Peroxidredoxina tipo IIBCD; **E:** Peroxidredoxina tipo IIE; **F:** Peroxidredoxina tipo IIFI; **G:** Peroxidredoxina tipo IIFII; **H:** 1-Cis-peroxidredoxina.

---

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Anotação dos genes de peroxirredoxinas (PRXs) de *Vigna unguiculata* e análise das sequências de aminoácidos

A família multigênica das peroxirredoxinas pode ser dividida em seis grupos distintos, denominados de A, B, C, D, E e F, baseado na similaridade de sequências primárias, estrutura e posição conservada dos resíduos de cisteína (HOFMANN, HECHT E FLOHÉ, 2002). O grupo E compreendem as peroxidases encontradas em bactérias e o grupo F as peroxidases similares às PRXs encontradas no domínio Archaea (CLARKE *et al.*, 2010). Já os grupos A ao D são PRXs conservadas em plantas superiores. No genoma de *A.thaliana*, são encontrados dez genes que codificam para cada uma dos quatro tipos de PRXs (HORLING *et al.*, 2002). Em plantas, as PRXs são, também, divididas em dois grupos denominados de peroxirredoxinas típicas e peroxirredoxinas atípicas (DIETZ, 2011). As PRXs do grupo A são correspondentes as típicas 2-Cys peroxirredoxinas (2CysPrx); grupo B, as típicas 1-Cys-peroxirredoxinas (1CysPrx); o grupo C, as peroxirredoxinas tipo Q (PrxQ); e o grupo D, as peroxirredoxinas tipo II (PrxII), sendo os dois últimos grupos denominados de peroxirredoxinas atípicas (WOOD *et al.*, 2003). Baseado nas etiquetas de sequências expressas (*expressed sequence tags* - EST) de *V. unguiculata* depositadas no NCBI, foi possível deduzir e anotar, oito genes que codificam PRXs. Dos oito genes anotados três são referentes às PRXs típicas (Vu2CysprxA, Vu2CysprxB e Vu1Cysprx) e outros cinco genes referentes às PRXs atípicas (VuPrxQ, VuPrxIIBCD, VuPrxIIE, VuPrxIIFI e VuPrxIIFII).

A análise dos genomas já sequenciados de organismos como *A.thaliana* e *O.sativa* demonstram a presença de, pelo menos, seis isoformas de PRXs comuns nesses organismos. Uma isoforma de PRXs (1CysPrx) relacionada a embriogênese, uma ou mais isoformas

---

citossólicas ou PrxII (Prx tipo II A, B, C e D), isoformas plastidiais (PrxIII), uma isoforma mitocondrial (PrxIIF) e duas isoformas de cloroplasto (PrxQ e 2CysPrx) (DIETZ *et al.*, 2006). Entretanto, esse padrão de localização está sujeito à variação significativa entre as espécies de plantas. Em *V. unguiculata*, foram anotados dois genes referentes à 2CysPrx (*Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*), um gene *Vu1CysPrx* e outros dois genes, *VuPrxQ* e *VuPrxIII*, semelhantes aos descritos em *A.thaliana*, enquanto que, em *O.sativa*, são descritos apenas um gene para 2CysPrx (DIETZ *et al.*, 2006). Em *A. thaliana*, são descritos quatro isoformas citossólicas de PRXs (tipo II A, B, C e D), uma PrxIII e uma PrxIIF (BHATT E TRIPATHI, 2011) enquanto que, em *V. unguiculata*, apenas uma única isoforma citossólica de PRXs (*VuPrxIIABCD*) foi anotada e duas isoformas mitocondriais de PrxIIF (*VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII*).

Como mencionado anteriormente, a classificação das PRXs é baseada na similaridade de sequência de resíduos de aminoácidos, estrutura e posição conservada dos resíduos de cisteína (HOFMANN, HECHT E FLOHÉ, 2002). A partir do alinhamento das sequências de aminoácidos de cada uma das PRXs de *V. unguiculata*, foi possível identificar diferenças entre cada uma das isoformas. A sequência da isoforma deduzida a partir da *Vu1CysPrx* apresentou 218 aminoácidos e apenas um resíduo de cisteína na porção N-terminal, similar ao observado na 1CysPrx de *Hordeum vulgare* (STACY *et al.*, 1999). As sequências deduzidas a partir das isoformas *Vu2CysprxA* e *Vu2CysprxB* apontaram a existência de 262 e 260 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e duas cisteínas, sendo uma na porção N-terminal (cisteína peroxidásica - Cys<sub>P</sub>) e outra na região C-terminal (cisteína de resolução - Cys<sub>R</sub>). Como observado em *A.thaliana*, essas cisteínas estão separadas por 120 resíduos de aminoácidos e, em ambas as isoformas de 2CysPrx, também foram observados os motivos FFYPLDFTFVCPT, EVCP, GGLG, e YF, comuns a várias 2CysPrx de eucariotos (HALL, KARPLUS E POOLE *et al.*, 2009). Esses motivos funcionam como sensores redox, e

---

a presença deles sugerem uma maior propensão à hiperoxidação, o que permite haver sinalização redox dependente de EROs para o núcleo (DIETZ, 2011).

Em relação à VuPrxQ, sua sequência deduzida apresentou 213 resíduos de aminoácidos, com duas cisteínas envolvidas no mecanismo catalítico, separadas por apenas 4 resíduos, padrão esse, bastante similar ao observado para PrxQ de *Populus tremula* (ROUHIER *et al.*, 2004).

Nas isoformas de peroxirredoxinas tipo II, representadas por VuPrxIIBCD, VuPrxIIE e VuPrxIIFI, contendo 162, 216 e 197 resíduos de aminoácidos, respectivamente, os resíduos de cisteína peroxidásica (Cys<sub>P</sub>) e de resolução (Cys<sub>R</sub>) estão espaçados por 24 resíduos. Apenas VuPrxIIFI, com 104 resíduos, apresentou somente 1 único resíduo de cisteína. Como observado por DIETZ, 2011 e demonstrado em *V. unguiculata*, esse grupo de PRXs apresentou maior diversificação com maior número de isoformas.

#### 4.2 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Através da análise filogenética dos genes das PRXs das espécies de *V. unguiculata*, *P.vulgaris*, *O.sativa* e *A.thaliana* foi possível classificar a família multigênica das PRXs em quatro clados bem distintos (**Fig. 2**), dentro uma relação de homologia entre as sequências dos diferentes genes das ordens Fabales, Poales e Brassicales. Segundo Bhatt e Tripathi, 2011, através da análise dos genomas de plantas já sequenciados, as PRXs podem ser organizadas em quatro subclasses distintas 1CysPrx, 2CysPrx (típicas), PrxQ e PrxII (atípicas) com base no número de resíduos de cisteínas conservados, subunidades e mecanismo catalítico. O resultado mostrado na figura 2 classificou as PRXs de *V. unguiculata* em quatro tipos de subfamílias bem distintas e separadas. De acordo com o resultado, uma grande diversificação foi demonstrada pela subfamília das peroxirredoxinas tipo II (*PrxII*).

---

Essa grande diversificação é resultante da separação evolutiva precoce das PrxII em isoformas mitocondriais (*VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII*), plastidiais (*VuPrxIIE*), citosólicas (*VuPrxIIBCD*) como resultado das especializações metabólicas dos sistemas antioxidantes complexos DIETZ, 2011. Em genomas pequenos como o de *Prochlorococcus marinus*, as PRXs são codificadas por apenas três genes que expressam três isoformas de PRXs, sendo uma 2CysPrx, uma PrxQ e uma PrxII, enquanto que em *Nostoc punctiforme*, que apresenta uma especialização metabólica mais complexa, são sete genes que codificam para diferentes PRXs (BERNROITNER *et al.*, 2009). As subfamílias 1CysPrx, 2CysPrx, PrxQ de *V. unguiculata* foram agrupadas próximas as sequências de PRXs de *P. vulgaris* seguido das PRXs de *A. thaliana* e *O. sativa*.

### **4.3 Análises dos oligonucleotídeos iniciadores específicos por PCR convencional e RT-qPCR quantitativa**

Por PCR convencional, com gradiente de temperatura, e usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para PRXs foi possível amplificar um produto específico em todas as temperaturas testadas (**Fig. 3**). Esse resultado foi confirmado por PCR quantitativa (RT-qPCR), também com gradiente de temperatura, visto que as curvas de dissociação dos oito genes que codificam as PRXs mostraram a presença de um único pico, evidenciando que um único produto foi amplificado e que não houve formação de dímeros dos iniciadores (**Fig. 4**). Para o gene codante da Vu1CysPrx, contudo, quando foi utilizado cDNA obtido de folhas de feijão-de-corda, não foi observada amplificação de produto (dados não mostrados) evidenciando ausência ou pouca expressão desse gene em folhas nas condições testadas. A 1CysPrx foi primeiramente identificada como uma proteína relacionada com a dormência em embriões e na camada de aleurona de grãos de cariopse de cevada (AALEN *et al.*, 1994). O

---

gene (*Pep1*) que codifica essa 1CysPrx é quase que, exclusivamente, expresso em sementes, e seu produto acumula-se no núcleo dos embriões (STACY *et al.*,1999). Tal padrão de expressão justifica a ausência desse transcrito quando se utiliza cDNA de folha. Dados que foram confirmados após reação de PCR convencional e quantitativa utilizando cDNA, oriundos de RNAs extraídos de vagens em desenvolvimento. Baseado nos resultados a partir das reações de RT-qPCR a temperatura de anelamento ótima para cada par de iniciadores foi obtida como mostrado na (**Tab. 2**).



## CAPÍTULO II

Peróxido de Hidrogênio e Genes Antioxidantes  
Desempenham Papel Fundamental na Resistência do  
feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] ao fungo  
*Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz) Penz & Sacc.]

## 1. HIPÓTESE

A resistência de plantas de feijão-de-corda, genótipo BR3, ao fungo *C. gloeosporioides* está associada ao aumento do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas fases iniciais da interação e modulação da expressão de genes antioxidantes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos geral

Avaliar o papel do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a expressão transcricional de genes antioxidantes na resistência de feijão-de-corda, genótipo BR 3, ao fungo hemibiotrófico *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1).

### 2.2 Objetivos específicos

- Entender qual é o papel do  $H_2O_2$  e do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) nas estratégias de defesa e possível sinalização no feijão-de-corda, em resposta à infecção pelo *C. gloeosporioides*;
- Avaliar as repostas associadas ao estresse oxidativo causadas pelas espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Estudar a cinética de infecção do feijão-de-corda pelo *C. gloeosporioides* por meio da microscopia óptica e associar sua dinâmica com as repostas bioquímicas de defesa;

- Estudar a cinética de infecção do feijão-de-corda pelo *C. gloeosporioides* por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), em busca de possíveis alterações ultra-estruturais na planta, nas fases de desenvolvimento do fungo na interface de interação planta-patógeno;
- Analisar o perfil transcricional de 14 genes alvos codificantes para dismutases de superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalases (CAT) e peroxirredoxinas (PRX), possivelmente envolvidos na defesa antioxidante e manutenção da homeostase redox durante a infecção do feijão-de-corda, cultivar BR 3, pelo *C. gloeosporioides*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes**

Reagente para extração de RNA (*RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit*) e DNase livre de RNase (*RNase-Free DNase*) foram obtidos da Qiagen (Alemanha). Reagente para RT-PCR (kit *ImPromII<sup>™</sup> Reverse Transcription System*) foi obtido da Promega (USA). Reagente para reações de qPCR (*Power IX SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix*) foi adquirido da Applied Biosystems (USA). Ácido tiobarbitúrico, ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), albumina sérica bovina (BSA), peróxido de hidrogênio e cloreto de nitroazul tetrazolium (NBT), foram obtidos da Sigma Aldrich (USA). Os demais reagentes, de grau analítico, foram adquiridos comercialmente.

#### **3.2 Material biológico**

##### **3.2.1 Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo BR 3 Tracuateua**

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo BR 3 Tracuateua, foram obtidas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Meio Norte, Teresina - PI.

### 3.2.2 Fungo fitopatogênico

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (isolado LPVD-1), usado na inoculação das plantas, foi obtido na micoteca do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Germinação e cultivo das plantas

Sementes de feijão-de-corda, genótipo BR 3, foram previamente selecionadas e submetidas à desinfestação superficial com hipoclorito de sódio, contendo 0,05% (v/v) de cloro ativo, por 3 min. O hipoclorito residual foi removido por lavagem exaustiva com água destilada. Após lavadas, as sementes foram embebidas em água destilada por 20 min, para a pré-hidratação. A semeadura (300 sementes) foi realizada dispondo as sementes paralelamente em papel de germinação (Germitest<sup>®</sup> 30 x 60 cm), previamente esterilizado por autoclavagem (121 °C;  $1,5 \times 10^5$  Pascal), duas vezes, por 30 min. Após 3 dias, as sementes germinadas foram transferidas para vasos plásticos de 1,0 L, 3 sementes por vaso, contendo areia de rio previamente lavada autoclavadas duas vezes a 120 °C,  $1,5 \times 10^5$  Pascal, durante 30 min sendo mantidos em casa de vegetação, sob condições de temperatura média de  $35 \pm 2$  °C durante o dia e  $27 \pm 2$  °C durante à noite e expostas a um gradiente de luz natural variando de  $300-650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiação fotossinteticamente ativa (PAR = *photosynthetically active radiation*), durante 12 h, e 12 h no escuro. Nos vasos, as plantas foram regadas diariamente com água destilada até o 3º dia após a transferência, sendo,

---

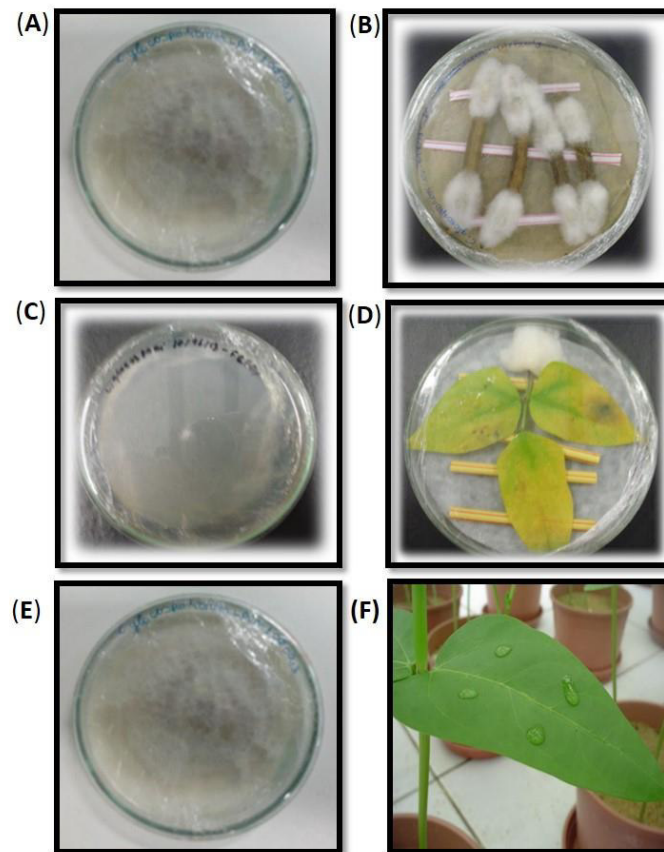
posteriormente, regadas com solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950) modificada (SILVEIRA *et al.*, 2001), aplicada em diluições decrescentes no 4° dia (10 x diluída), 5° dia (5 x diluída), 6° dia (2 x diluída) e a partir do 7° dia em diante aplicada na concentração normal, com volume fixo de 100 mL por vaso.

### 3.3.2 Aumento da patogenicidade do fungo *C. gloeosporioides*

O procedimento para recuperação da virulência do fungo *C. gloeosporioides* foi conduzido de acordo com Moura, (2013) como mostrado na figura 1. Inicialmente, inóculos contendo micélios de *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) plaqueados em meio Batata-Cenoura-Ágar (BCA) (**Fig. 1A**), foram inoculados em vagens de feijão-de-corda genótipo TE-97 411-1F, previamente cortadas em pedaços de cerca de 6 cm e acomodadas em placas de Petri (contendo 4 vagens) forradas com papel de filtro (germtest®) saturado com água (**Fig. 1B**). As placas contendo as vagens foram autoclavadas duas vezes a 120 °C, 1,5 x 10<sup>5</sup> Pascal durante 30 min. O fungo inoculado sobre as vagens dispostas nas placas foi incubado sob as seguintes condições de crescimento: 28 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 h claro/escuro. Sete dias após inoculação, pedaços do micélio foram retirados e repicados em placas de Petri contendo ágar (**Fig. 1C**). Decorridos cinco dias de crescimento foi realizada a raspagem do micélio com água Milli-Q estéril a partir da qual foi obtida a suspensão de conídios que foi utilizada na inoculação de folhas secundárias de plantas de feijão-de-corda, genótipo TE-97-411-1F (**Fig. 1D**). As folhas foram excisadas de plantas com doze dias de idade e colocadas em placas de Petri (contendo papel de filtro umedecido) previamente autoclavado. Para manutenção da turgidez celular, o pecíolo foliar foi embebido em algodão contendo solução de sacarose 2% (m/v).

---

Sete dias após a inoculação e aparecimento de sintomas, o fungo foi isolado a partir de micélios desenvolvidos sobre a superfície foliar, mantido em ágar e após crescimento, transferido para o meio BCA (**Fig. 1E**). Doze dias após o repique do fungo *C. gloeosporioides* em meio BCA, foi realizada raspagem do micélio usando água Milli-Q estéril com auxílio de alça de Drigalski. A suspensão foi filtrada em malha de nylon para a retenção das hifas e a concentração da suspensão de conídios quantificada com auxílio da câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60) e ajustada para  $2,0 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ , que foi utilizada na inoculação das plantas (**Fig. 1F**). Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar e as placas vedadas e mantidas em incubador tipo BOD no Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa.



**Figura 1.** Cultura monospórica de *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1). (A): cultura monospórica em meio BCA; (B): *C. gloeosporioides* desenvolvido sobre vagens autoclavadas de feijão-de-corda genótipo TE-97 411 1-F; (C): *C. gloeosporioides* em ágar; (D): Micélio de *C. gloeosporioides* sobre folhas secundárias de feijão-de-corda genótipo TE-97 411 1-F; (E): *C. gloeosporioides* em meio (BCA) e (F): inoculação das plantas de feijão-de-corda genótipo BR-3 com suspensão de conídios ( $2,0 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) de *C. gloeosporioides*.



### 3.3.3 Cultivo e obtenção da suspensão de conídios de *C. gloeosporioides*

A suspensão de esporos de *C. gloeosporioides* foi obtida pela replicação do fungo em meio de cultura BCA, em placas de Petri, à temperatura de  $28 \pm 3$  °C e fotoperíodo de 12 h claro/escuro durante 10 dias. Após esse período, as placas foram abertas em câmara de fluxo laminar e o micélio lavado com água grau Milli-Q estéril, sendo os conídios desprendidos com auxílio de uma alça de Drigalsky. Em seguida, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina estéril, dobrado em 4 camadas, para exclusão do micélio e do meio de cultura. A suspensão contendo os conídios foi, então, diluída 10x em água Milli-Q estéril e a concentração da suspensão de conídios determinada com o auxílio de câmara de Neubauer, sendo a visualização e contagem feitas em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60).

### 3.3.4 Inoculação com a suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* e coleta das folhas

A suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* ( $2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>) foi aplicada na superfície adaxial das folhas primárias, totalmente expandidas, de plântulas de feijão-de-corda, genótipo BR 3, 12 dias após a semeadura (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Duas gotas, de 50 µL cada da suspensão, foram depositadas de cada lado do limbo foliar, separado pela nervura principal (**Fig. 1F**), e espalhadas em toda sua superfície com o auxílio de um pincel de cerdas finas. O grupo de plântulas controle foi cultivado na mesma condição descrita anteriormente, mas inoculado apenas com água Milli-Q estéril. As folhas primárias de ambos os tratamentos foram coletadas nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI, identificadas e, imediatamente, imersas em nitrogênio líquido para rápido congelamento. Em seguida, essas folhas foram acondicionadas em ultra-freezer (-80 °C) para posteriores

---

análises bioquímicas e moleculares. Todos os experimentos foram conduzidos com três replicatas biológicas, sendo que, para cada replicada, folhas primárias oriundas de três plântulas diferentes foram coletadas, para cada tempo experimental.

### 3.3.5 Análise macroscópica dos sintomas da infecção

Os possíveis sintomas visuais da doença antracnose, causada pelo *C. gloeosporioides* no feijão-de-corda, BR 3, foram avaliados nas folhas primárias infectadas com a suspensão de conídios de *C. gloeosporioides* ( $2 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup>), nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI.

### 3.3.6 Quantificação de proteínas

A extração das proteínas solúveis das folhas primárias de feijão-de-corda, BR 3, controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*) com o *C. gloeosporioides*, coletadas 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI, foi feita usando 0,3 g de folhas primárias. Um pó fino foi preparado com auxílio de N<sub>2</sub> líquido, em gral + pistilo, sob banho de gelo, e tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,5 M, ácido ascórbico 30 mM, EDTA 3 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP, 1%), adicionado na proporção de 1:3 (m/v). A suspensão foi macerada manualmente por 10 min e, após, incubada a 4 °C, por 2 h. Em seguida, foi centrifugada a 12.000 x g por 15 min, a 4 °C. A concentração de proteínas no sobrenadante coletado foi mensurada (BRADFORD, 1976) a partir de um fator de correção gerado após construção de uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), sendo as absorvâncias, a 595 nm, lidas em espectrofotômetro modelo Genesys 10S UV-vis (Thermo Scientific, USA).

### 3.3.7 Determinação qualitativa da presença de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

A avaliação qualitativa do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) nas folhas inoculadas e não inoculadas com *C. gloeosporioides* foi realizada utilizando NBT (cloreto de nitroazul tetrazólium) (KUMAR *et al.*, 2014). Nesse experimento foram analisadas amostras controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*) nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI. O NBT (0,1 g) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, sendo volume final ajustado para 50 mL. Na análise, folhas primárias inoculadas e não inoculadas foram destacadas da planta, na região de contato do pecílio com o caule, com auxílio de um estilete, nos tempos citados anteriormente, e sua base imersa em solução de NBT, por 12 horas. Em seguida, os pigmentos foliares foram removidos com solução composta por 1,5 g de TCA (ácido tricloacético) + 750 mL de etanol + 250 mL de clorofórmio, em placas de Petri e várias trocas, até a folha se apresentar transparente. O resultado foi considerado positivo quando havia presença de precipitados de azul de formaza, indicativo da reação do NBT. A fotodocumentação foi realizada com auxílio de câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

### 3.3.8 Determinação qualitativa da presença de peróxido de hidrogênio

A determinação quantitativa de  $H_2O_2$  foi feita de acordo com Thordal-Chistensen *et al.*, (1997) em folhas controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*) 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI. Este método basea-se na reação do  $H_2O_2$  com a diaminobenzidina que foi preparada dissolvido-se 100 mg em 50 mL de água grau Milli-Q sendo o pH ajustado para 3,0, com HCl 1,0 N (passo necessário para solubilização do DAB). Em seguida, a solução foi incubada a 50 °C sob agitação constante, por 1 h. Decorrido esse período, o pH foi ajustado para 4,0, com NaOH 1

---

N, e o volume final aferido para 100 mL. Folhas primárias inoculadas e não inoculadas foram destacadas da planta, na região de contato do pecíolo com o caule, posta em contato (12 h) com a solução de DAB e despigmentadas como descrito no item anterior. O resultado foi considerado positivo quando havia presença de halos castanhos avermelhados, indicativo da reação do DAB com o peróxido de hidrogênio. A fotodocumentação foi realizada com auxílio de câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

### 3.3.9 Determinação quantitativa de peróxido de hidrogênio

O teor de peróxido de hidrogênio foi mensurado de acordo com o protocolo descrito por Gay *et al.*, (1999). Folhas primárias controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*) foram destacadas como descrito no item 2.3.7 e o teor de peróxido de hidrogênio analisado nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI. As folhas foram pesadas (0,5 g) e homogeneizadas com tampão borax-borato, 50 mM, pH 8,4, em gral, sob banho de gelo, na proporção de 1:3 (m/v). Logo após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada por 20 min, 12000 x g, 4 °C, e o sobrenadante usado no ensaio. A mistura reacional consistiu de 500 µL do sobrenadante + 1 mL da solução de alaranjado de xilenol (100 µL da solução A, constituída de FeSO<sub>4</sub> 25 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 mM e água grau Milli-Q, q.s.p 10 mL + 10 mL da solução B, constituída de alaranjado de xilenol 125 µM, sorbitol 100 mM e água grau Milli-Q, q.s.p 100 mL). A reação procedeu por 30 min, à temperatura ambiente (24 ± 2°C), e a absorbância lida a 560 nm. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (0,5 – 4,0 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi construída e usada para determinação do teor de peróxido de hidrogênio nos tecidos foliares. Os resultados foram expressos em µmol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) . gMF<sup>-1</sup>.

### 3.3.10 Determinação da peroxidação de lipídeos

O teor de peroxidação de lipídeos foi determinado segundo a metodologia descrita por Peever e Higgins (1998) com modificações feitas por Peixoto et al., (1998). Folhas primárias controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*) foram destacadas e o teor de peroxidação de lipídeos analisado nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI. As folhas (0,2 g) foram homogeneizadas na proporção 1:3 (m/v) com TCA a 1%, em geral, sob banho de gelo. A suspensão obtida foi centrifugada a 12000 x g, por 15 min, 4 °C, e o sobrenadante utilizado nas determinações. A 500 µL do sobrenadante, 2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5% em TCA a 20% foram adicionados e a mistura imediatamente incubada em banho-maria, a 95 °C, por 2 h. A reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g, por 10 min, 25 °C, e a absorbância lida em duas faixas de comprimento de onda (532 e 660 nm). Para o cálculo do teor de peroxidação de lipídeos, os valores de absorbância lidos a 532 nm foram subtraídos dos valores obtidos a 660 nm (Sudhakar *et al.*, 2001). A quantificação do complexo MDA-TBA (Molonaldeído – Ácido triobarbiturico) formado foi determinada utilizando o coeficiente de absorvidade de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em nmol (MDA-TBA) . gMF<sup>-1</sup>.

### 3.3.11 Análise microscópica da cinética de infecção do feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*

#### 3.3.11.1 Análise por microscopia óptica (MO)

As análises microscópicas foram conduzidas com o intuito de analisar o desenvolvimento e compreender as estratégias de infecção do *C. gloeosporioides*. Folhas primárias controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*) foram destacadas nos tempos de 4, 8, 12, 24, 48

---

e 72 HAI, cortados em discos e despigmentadas. Para visualização das estruturas dos fungos, os discos foliares foram dispostos sobre lâmina de vidro e coloridas com azul de anilina (Balows *et al.*, 1991). As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (Olympus System Microscope BX 60) sob luz branca e as imagens capturadas com sistema de câmera digital Sony Cyber-Shot DSC-W320.

### **3.3.11.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da cinética de infecção do feijão-de-corda, pelo *C.gloeosporioides***

Com o intuito de capturar detalhes da progressão do processo de desenvolvimento do *C. gloeosporioides* nas folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, experimentos de microscopia eletrônica de varredura foram conduzidos, segundo metodologia já descrita (GE & GUEST, 2011), mas com modificações. A partir de folhas primárias inoculadas (*Cg*), coletadas nos tempos de 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI, foram obtidos discos foliares que foram fixados em tampão fosfato de sódio 0.05 M, pH 7.2, contendo 4% (v/v) de formaldeído e 2.5% (v/v) de glutaraldeído, por cerca de 12 h, ao invés de 2 h, à temperatura ambiente ( $24 \pm 2$ ). Subsequentemente, as amostras foram lavadas três vezes com o tampão fosfato de sódio, com 10 min entre cada lavagem, fixadas em 1% (m/v) de tetróxido de osmium preparado no mesmo tampão fosfato, por 1 h, desidratadas em gradiente seriado de etanol-acetona (50, 60, 70, 90 e 100% [v/v]) e secas usando hexametildisilazo-etanol (HMDS-etanol, 1:1 [v/v]) e 100% (v/v) hexametildisilazo (HMDS) (passo modificado – ao invés de ser usado câmara de ponto crítico). Após processados, os discos foliares foram montados sobre lamina de aço inox com auxílio de fita adesiva dupla face 3M<sup>®</sup> e revestida com fina camada de ouro de 20 nm de espessura em uma máquina de revestimento por crepitação (EMITECH - Q150TES, Quorum Technologies<sup>®</sup>, Inglaterra. As imagens geradas pelo MEV foram obtidas a 20000 kV

---

em um microscópio modelo Inspect™ 50 FEI *Scanning Electron Microscope* (Oregon USA) equipado com um detector de baixa energia [*Everhart-Thornley detector (ETD)*] na Central de Microscopia e Microanálises Avançada (Central Analítica) da Universidade Federal do Ceará.

### **3.3.12 Análise de expressão de genes alvo por RT-qPCR**

#### **3.3.12.1 Extração e purificação dos RNAs**

Para extração de RNA total, folhas primárias controles (*Cont*) e inoculadas (*Cg*), coletadas nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 HAI foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo. A partir de 100 mg do material vegetal macerado obtido, o RNA total foi extraído com auxílio do Kit *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para extração 100 mg de material vegetal, 450 µL do tampão de lise RLT, adicionado de 10 µL de β-mercaptoetanol, foram adicionados e homogeneizados por 30 s em vórtex com agitação constante. A suspensão obtida foi então transferida para uma coluna (Qiasheder spin column) acoplada a um tubo coletor de 2 mL que foi posteriormente centrifugado a 14.000 x g, por 2 minutos a 25 °C. O filtrado obtido (± 400 µL) foi transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL ao qual foram adicionadas 400 µL de etanol 95% e homogeneizados por inversão. A solução obtida (± 800 µL) foi transferida para uma nova coluna do kit (RNeasy mini spin column), acoplada a um tubo coletor de 2 ml e centrifugada a 10.000 x g, por 15 s a 25 °C. O filtrado obtido foi descartado e na coluna foram adicionado 350 µL de tampão de lavagem RW1, sendo em seguida centrifugada a 10.000 x g, por 15 s a 25 °C. O filtrado foi descartado e no centro da coluna foram aplicados 80 µL da enzima RNase-Free DNase Set (Qiagen) e incubado a temperatura ambiente durante 15 min. Após o período de incubação, foi realizada uma nova adição de 350

---

$\mu\text{L}$  do tampão de lavagem RW1 e a coluna contendo a amostra centrifugada a  $10.000 \times g$ , por 15 s a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A coluna contendo os RNAs ligados foi transferida para um novo tubo coletor e em seguida foram adicionados  $500 \mu\text{L}$  da solução RPE na coluna, sendo em seguida submetida a uma centrifugação a  $10.000 \times g$ , por 15 segundos a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . O filtrado foi descartado e a coluna adicionado mais  $500 \mu\text{L}$  da solução de RPE sendo em seguida novamente submetida a uma nova centrifugação a  $10.000 \times g$ , por 2 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . O filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Para eluição do RNA foram adicionados  $40 \mu\text{L}$  de água livre de RNases diretamente na coluna, incubado por 1 min e submetendo a nova centrifugação a  $10.000 \times g$ , por 1 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . O RNA eluído foi acondicionado em gelo e armazenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior quantificação, análises de integridade por eletroforese, reações de transcrição reversa (RT) e ensaios de RT-qPCR. Todo o experimento foi conduzido em triplicata biológica sendo o material foliar de cada repetição representativo de 3 organismos diferentes.

### **3.3.12.2 Análise da integridade, quantificação e pureza dos RNAs totais**

A integridade do RNA total e possível contaminação com DNA genômico foram avaliadas usando  $0,3 \mu\text{g}$  de RNA total, que foi aplicado em gel de agarose (1%, m/v), preparado em tampão MOPS constituído de ácido 3-N-morfolino propano sulfônico (200 mM), acetato de sódio (50 mM) e ácido etilenodiaminotetracético (10 mM). O gel de agarose, ainda fundido, foi disposto em uma cuba eletroforética de 50 mL e, após solidificação, imerso no tampão MOPS 10x diluído contido no sistema de eletroforese. Cada amostra de RNA, solubilizado em água grau Milli-Q, foi adicionada de tampão tris-HCl, 125 mM, pH 8,0,



---

contendo traços de azul de bromofenol, na proporção de 1:4 (v/v, amostra/tampão), perfazendo volume final de 6  $\mu\text{L}$ .

Tão logo as amostras foram aplicadas, o sistema foi acoplado a uma fonte de energia e submetido à corrente de 60 mA, 100 V e 10 W, por cerca de 45 min. Após a corrida eletroforética, o gel foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 10 min, sob agitação constante. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com água destilada para remoção do excesso de brometo de etídio. A visualização do RNA ribossomal (18S e 28S) foi feita utilizando transluminador de luz UV, sendo fotodocumentado usando sistema *Mini BIS Pro* (Bio-Imaging Systems), com auxílio do programa *GEI Capture*<sup>TM</sup>.

O RNA total foi quantificado baseado no coeficiente de absorvidade ( $40 \text{ ng}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), medido a 260 nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA). A pureza de todos os RNAs foi aferida com base nos valores de absorbâncias obtidos a 230, 260 e 280 nm e suas relações (r) entre: 260/280, para ausência de contaminantes proteicos ( $r \approx 2$ ), e 260/230, ausência de contaminantes glicídicos ( $2,0 \leq r \leq 2,2$ ). Para verificar a ausência de DNA genômico nessas preparações de RNA, foi realizada RT-qPCR, usando iniciadores específicos para várias peroxirredoxinas (*Vu2CysPrxA*, *Vu2CysPrxB*, *VuPrxIIFI*, *VuPrxIIFII*) e uma mistura de todos os RNAs extraídos das amostras controles e inoculadas. A reação foi conduzida em termociclador *Mastercycler*<sup>®</sup> *ep realplex* (Eppendorf AG, Hamburg) usando placas de 96 poços. A mistura de reação consistiu de 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (300 nmol), 4  $\mu\text{L}$  da mistura dos RNAs (200 ng) de plantas controles e inoculadas, 10  $\mu\text{L}$  x *Power SYBR Green PCR Master Mix* e 4  $\mu\text{L}$  de água grau Milli-Q, contabilizando volume final reacional de 20  $\mu\text{L}$ . A temperatura ótima de anelamento para cada iniciador foi obtida com base nos resultados definidos na reação de gradiente de temperatura entre 47 - 65°C (**Tabela 1, Cap. 1: resultados**). A reação de RT-qPCR foi

---

conduzida seguindo os parâmetros: 10 min a 94 °C para ativação da enzima, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento de 57,5 °C a 63,6 °C por 20 s e extensão a 60 °C por 20 s. Após amplificação, seguindo a programação acima, curvas de fusão foram construídas automaticamente utilizando dados de fluorescência (F) em função da temperatura (T), gerados a partir de reação programada pelo próprio termociclador: 94 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s, seguido por aquecimento lento até 94 °C com incrementos de temperatura de a 0,03 °C s<sup>-1</sup>.

### **3.3.12.3 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase (RT-PCR) para síntese do DNA complementar (cDNA)**

A síntese do cDNA foram conduzidas usando 1 µg de RNA e o Kit da ImpromII<sup>TM</sup> *Transcriptase Reversa* (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi iniciada pela adição de 1 µg de RNA total, oligodT<sub>15</sub> e incubação por 70 °C durante 5 min. Em seguida, 8,4 µL de uma solução contendo MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs 10 mM, tampão de reação 5x, água livre de RNases e 1 uL da enzima Improm II transcriptase reversa foram adicionados. A reação de síntese da fita complementar foi conduzida por 1 h a 42 °C, seguida por 15 min a 75 °C. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C para posteriores reações de RT-qPCR.

### **3.3.12.4 Iniciadores específicos dos genes de referência e alvos usados na análise de expressão, por transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).**

---

Baseado em dados prévios obtidos em estudos de interação entre *C. gloeosporioides* e feijão-de-corda (BARRETO *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2014), 14 genes alvos foram eleitos bem como 6 genes de referência foram usados na análise de expressão por RT-qPCR. Assim, iniciadores específicos foram desenhados para 3 genes de superóxido dismutase (*VuFeSODI*, *VuCuZnSODI* e *VuCuZnSODII*), 2 genes de catalase (*VuCATI* e *VuCATII*), 1 gene de peroxidase do ascorbato (*VuAPXI*) e 8 genes de peroxirredoxinas (*Vu1Cysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*, *VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII*). Todos esses iniciadores foram desenhados a partir de sequências de etiquetas expressas de *V. unguiculata* (*Etiquette Sequences Tags* - ESTs) selecionadas a partir dos resultados de busca no (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). A escolha dos melhores genes para normalização dos dados de expressão a serem obtidos por RT-qPCR foi feita entre 6 genes constitutivos: *Act5* (Actina 5); *F-box* (proteína Pha-F-box); *Insu* (insulinase); *EF1a2* (fator de alongação 1-alfa-2); *EF1a3* (fator de alongação 1-alfa-3); *EF1β* (fator de alongação 1 beta). Os iniciadores foram desenhados usando o programa *Perl Primer* v.1.1.19, temperaturas de fusão ( $T_m$ ) na faixa 57-64 °C, comprimento do iniciador de 18-24 bp e tamanho do fragmento a ser amplificado (*amplicon*) entre 80 a 230 bp (**Tab. 1**). Amostras de RNA total (1 µg) foram utilizadas nas reações de RT-qPCR. Após as reações de transcrição reversa, os cDNAs obtidos foram diluídos para uma concentração final de 25 ng/uL considerando a partir de uma concentração inicial de 1000 ng/µL, para todas as amostras analisadas.

**Tabela 1:** Sequência dos iniciadores dos genes de *Vigna unguiculata* alvos e de referência (normalizadores), tamanho do fragmento a ser amplificado (*amplicon*), número de acesso e temperatura ótima de fusão dos genes avaliados

Gene	Produto gênico	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Número de acesso	Temperatura ótima de fusão (T <sub>m</sub> °C)
<i>VuFeSODI</i>	Dismutase de superóxido Fe-dependente	Fwd GATGTTGACTTGGATGGTGTG Rev GGCTGAAGAGATTTAACCCCTG	109	FG922624.1	63,6
<i>VuCuZnSODI</i>	Dismutase de superóxido CuZn-dependente	Fwd GGTGCCCTGAGATCACATT Rev ACCATTTCCGTCCTGACTG	102	HQ259253.1	57,5
<i>VuCuZnSODII</i>	Dismutase de superóxido CuZn-dependente	Fwd GTCTCCGTTAGGCTCACTC Rev ATCGTCTTCTGTGTAGGGT	144	FG821686.1	63,3
<i>VuCATI</i>	Catalase	Fwd CCTGAAACCCAATCCCAAGTC Rev CCATCCATGTGCCTGTAATCC	188	FJ392008.1	57,6
<i>VuCATII</i>	Catalase	Fwd TCTTCCAATAGACACTTCA Rev GGCTGAAGAGATTTAACCCCTG	144	FJ392011.1	57,6
<i>VuAPXI</i>	Peroxidase do Ascorbato	Fwd CTACGCAGATTCTACCAGT Rev CATAGCCTTGCCGAACAC	172	GH621238.1	59,8
<i>Vu1CysPrx</i>	1-Cis-peroxirredoxina	Fwd TGAAGCCTACATTTCAGGTTG Rev AGTCTTTCTCTCAGGGTCA	104	GH619145.1	59,8
<i>Vu2CysPrxA</i>	2-Cis-peroxirredoxina A	Fwd AATTGCTCATCTGTATCAGTC Rev GTTCCATACATCATAAACCCGT	162	JF438998.1	57,5
<i>Vu2CysPrxB</i>	2-Cis-peroxirredoxina B	Fwd GCTCATCTGTATCAATTAATGGTG Rev GCACGCACAATCATTAGATAAG	112	JF438998.1	57,5
<i>VuPrxQ</i>	Peroxirredoxina Q	Fwd CAAAGCCACCGAATTTACACAC Rev AAGCACAAAGCCTGTTGGTA	132	FF553671.1	61,9
<i>VuPrxIIBCD</i>	Peroxirredoxina IIBCD	Fwd TGTATCAGTGTGAATGACCC Rev TAACACCAAGACCTTTCTCTG	150	FG911988.1	57,5
<i>VuPrxIIE</i>	Peroxirredoxina IIE	Fwd CTCATCTTCTACCACCGT Rev CGTCTTACCTCTCCATCTG	204	FG869427.1	59,8
<i>VuPrxIIFI</i>	Peroxirredoxina IIFI	Fwd ATGGTGAATCGAGGTGGTTG Rev GTCTTTGAGAGGAGTGGTGG	183	FG937809.1	57,5
<i>VuPrxIIFII</i>	Peroxirredoxina IIFII	Fwd TAAGGCTAAGAGGGTGCATTT Rev CAAACTTCTATGAAAGCTCCCA	139	XM_003541576.2	59,8

---

<i>Act5</i>	Actina 5	Fwd CTCCAACAGATGGGATCT Rev CCATCTTAGAAGCACTTCCG	81	FG936423.1	59,8
<i>EF1<math>\alpha</math>2</i>	Factor de elongação 1 $\alpha$ 2	Fwd GTAACAAGATGGATGCCACC Rev CCACTTTCTCAAATACGAGGAG	90	FG942624.1	61,9
<i>EF1<math>\alpha</math>3</i>	Fator de elongação 1 $\alpha$ 3	Fwd CAAGAGCGTGGAGAAGAAG Rev CAGCGTCTACAAGAAGACAC	135	FG928730.1	59,8
<i>EF-1<math>\beta</math></i>	Fator de elongação 1 $\beta$	Fwd GAGGATAAGAAGGCAGCA Rev AGGCTTAACATCGAGTAGG	96	FG935310.1	59,8
<i>Insu</i>	Insulinase	Fwd GCAACCAACCTTCATCAG Rev TCCTTTGCTCAATGTTCCC	143	FG9062104.1	57,5
<i>Pha-F-Box</i>	Proteína F-Box	Fwd GCTTATTCAATCCGCTTGTC Rev GTCCTATAACAGCTTCTCCA	148	FG812521.1	57,5

---

### 3.3.12.5 Análise de expressão dos genes alvos por RT-qPCR

A reação de RT-qPCR com os genes de referência e os 14 genes alvos foi realizada em termociclador *Mastercycler<sup>®</sup> ep realplex* (Eppendorf AG, Hamburg). O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços e a reação consistiu de 1 µL de cada iniciador (300 ηmol), 4 µL de cDNA (25 ηg/µL) 10 µL x *Power SYBR Green PCR Master Mix* e 4 µL de água grau Milli-Q, em um volume final de reação de 20 µL. A temperatura ótima de anelamento para cada par de iniciador foi obtida por meio de reações com gradiente de temperatura de 47 a 65 °C (**Tab. 1**). A reação de RT-qPCR foi conduzida seguindo os seguintes parâmetros: 10 min a 94 °C para ativação da enzima, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento de 57,5 °C a 63,6 °C por 20 s e extensão a 60 °C por 20 s. Após amplificação, seguindo a programação acima, curvas de fusão foram construídas automaticamente, utilizando dados de fluorescência (F) em função da temperatura (T), gerados a partir de reação programada pelo próprio termociclador: 94 °C durante 15 s, 60 °C durante 15 s, seguido por aquecimento lento até 94 °C com incrementos de temperatura de a 0,03 °C s<sup>-1</sup>.

### 3.3.12.6 Seleção, estabilidade de expressão e validação dos genes normalizadores do feijão-de-corda, em resposta à infecção pelo *C. gloeosporioides*

Seis genes candidatos a normalizadores tiveram sua estabilidade de expressão testada sob condições de estresse biótico, induzido por *C. gloeosporioides*, em 8 tempos distintos, ou seja, 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 HAI e seus respectivos controles. Os níveis de expressão dos genes *Act5*, *F-box*, *Insu*, *EF-1a2*, *EF-1a3* e *EF-1β* foram determinados pelo número de ciclos de amplificação necessários para detecção da fluorescência emitida pelo

---

*SYBR Green* ultrapassar o limiar durante a fase exponencial da reação de PCR, que é determinada pelos valores do limiar de detecção ( $C_t$ ). Os dados de  $C_t$  obtidos foram exportados do programa *Realplex* e importados para o programa *GeNorm* (Versão 2.4). A partir desses dados, foi calculada a estabilidade de expressão dos genes candidatos a normalizadores usando as médias dos valores de  $C_t$ , médias de estabilidade de expressão (valor M) e o número de genes necessários para a normalização nas condições testadas, por meio da variação da média em pares (valores V) (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). A partir dos dados de estabilidade obtidos, os de menores valores, foi possível identificar os melhores genes indicados para normalização.

### 3.3.12.7 Análise de expressão relativa dos genes

A análise de expressão relativa foi realizada usando o método do  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os cálculos dos níveis de expressão relativa normalizados foram feitos usando o software *qbase<sup>PLUS</sup>* versão 1.5 (Biogazelle) (HELLEMANS *et al.*, 2007). A normalização foi conduzida usando quatro genes de referência (*EF1 $\beta$* , *EF1a2*, *EF1a3* e *Insu*) escolhidos entre os 6 genes testados e validados usando o programa *genorm<sup>PLUS</sup>* módulo em *qbase<sup>PLUS</sup>* (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). As reações de RT-qPCR foram conduzidas em triplicata e os valores das médias dos  $C_t$  obtidos. Para todos os iniciadores foi admitida eficiência de 100%.

### 3.3.12.8 Análises estatísticas

O arranjo experimental foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos controles: (*Cont*) e inoculado (*Cg*), com três triplicatas independentes,

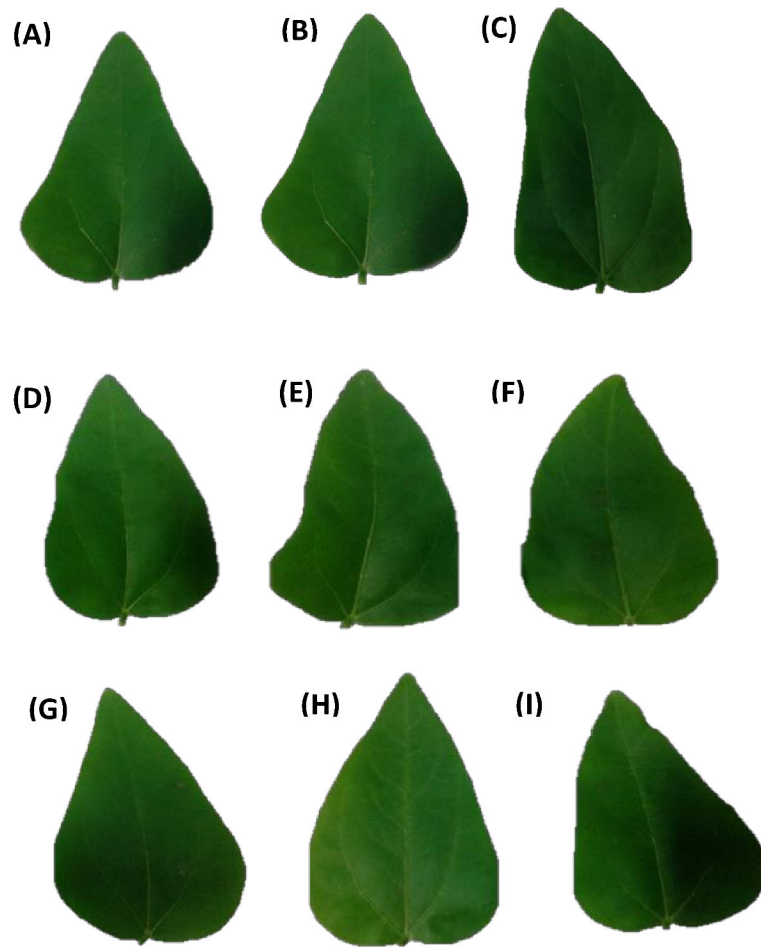
consistindo, cada uma, de três indivíduos oriundos de plantas em vasos diferentes. As análises bioquímicas e de RT-qPCR foram realizados em triplicata biológica. Os dados foram analisados usando o programa *ASSISTAT 7.7*, aplicando ANOVA e as diferenças significativas entre médias avaliadas usando o teste Tukey's ( $p \leq 0,05\%$ ).



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da presença de lesões em folhas de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides*

De acordo com Moura *et al*, (2014), o feijão-de-corda, genótipo BR 3, é resistente ao fungo *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1). De fato, as folhas primárias infectadas com *C. gloeosporioides* não apresentaram qualquer sintoma visível, como lesões necróticas, mesmo ao final do período experimental, 72 horas após inoculação (HAI) (**Fig. 2**).

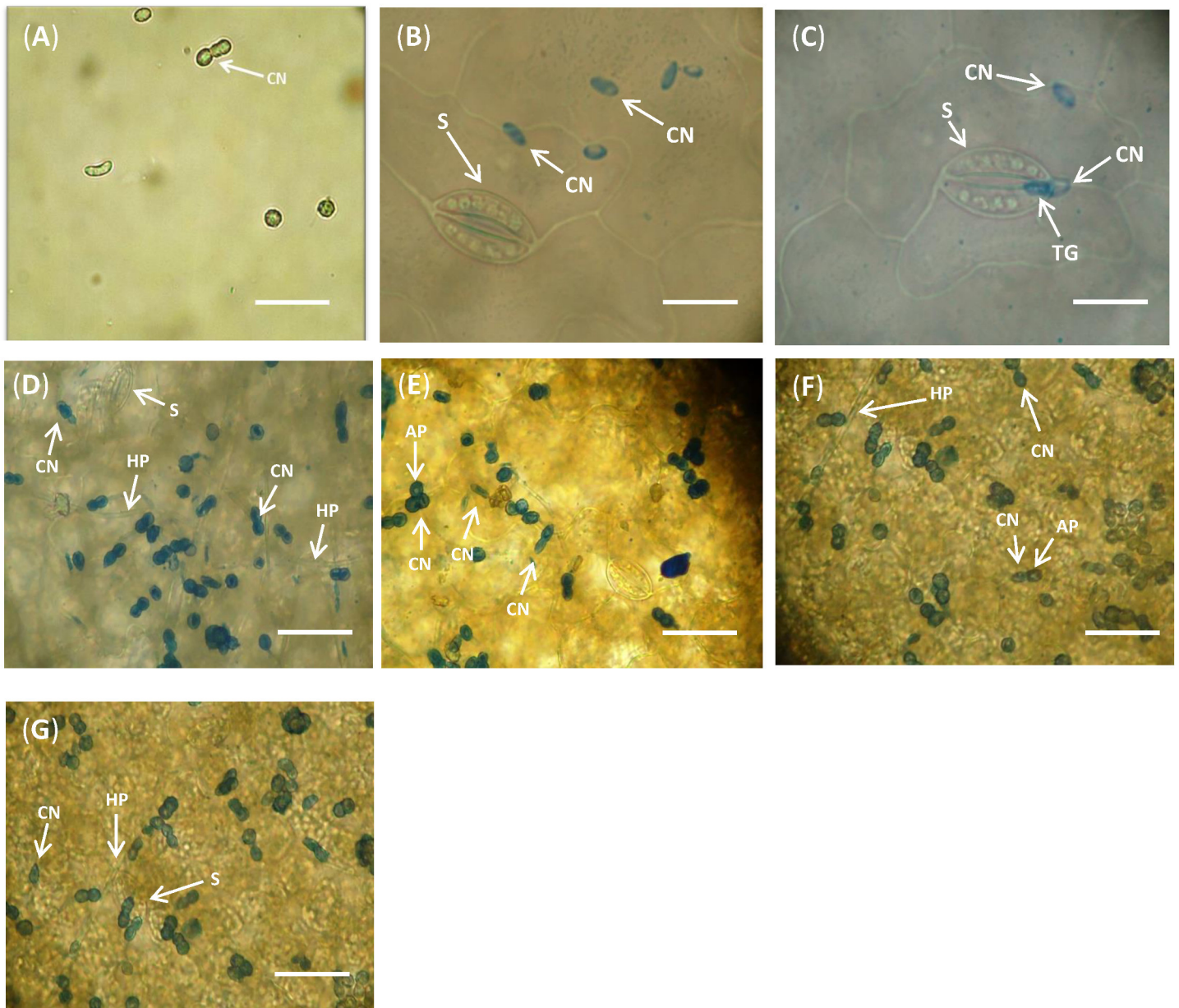


**Figura 2.** Folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides* ( $2 \times 10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). (A): folha controle (B): 0 hora após infecção (HAI); (C): 2 HAI; (D): 4 HAI; (E): 8 HAI; (F): 12 HAI; (G): 24 HAI; (H): 48 HAI; (I): 72 HAI.

---

#### 4.2 Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visto por microscopia de luz

Em água, os conídios de *C. gloeosporioides* se apresentavam, em sua maioria, ovais, com comprimento entre 5 - 10  $\mu\text{m}$  (**Fig. 3A**). Quando inoculados nas folhas primárias do feijão-de-corda, genótipo BR 3, os conídios assumiram forma septada, rapidamente, após aderirem à cutícula da superfície das folhas primárias do hospedeiro. Pela análise da infecção nos tempos de 4 e 8 HAI, uma maior quantidade de conídios aderiu mais próximo a estruturas como estômatos e nervuras (**Fig. 3B**). Com 8 HAI, houve formação de tubos germinativos a partir dos conídios (**Fig. 3C**), com a presença de apressórios 12 HAI, e o desenvolvimento sobre a superfície das folhas. As superfícies das folhas primárias foram extensivamente colonizadas pelo micélio 12 HAI, sobre os estômatos (**Fig. 3D**). A radiação das hifas primárias apresentaram pleno crescimento 24 HAI (**Fig. 3E**). Esse crescimento se estendeu sobre boa parte da superfície da célula hospedeira irradiando na tentativa de colonização de tecidos vizinhos (**Fig. 3F e G**).



**Figura 3.** Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visto por microscopia de luz. (A): conídios (CN) de *C. gloeosporioides* sobre a superfície de vidro. (B): conídios sobre a superfície foliar, 4 horas após infecção (HAI), próxima ao (S) estômato. (C): conídios 8 HAI, mostrando emissão de tubo germinativo (TG). (D): Hifas primárias (HP) e apressório (AP) 12 HAI sobre a epiderme. (E), (F) e (G): Desenvolvimento hifal na superfície das folhas 24, 48 e 72 HAI, respectivamente. Em (A), (B) e (C): Barra = 20  $\mu\text{m}$  e (D), (E), (F) e (G) Barra = 50  $\mu\text{m}$

---

### 4.3 Avaliação da presença do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em folhas primárias de feijão-de-corda

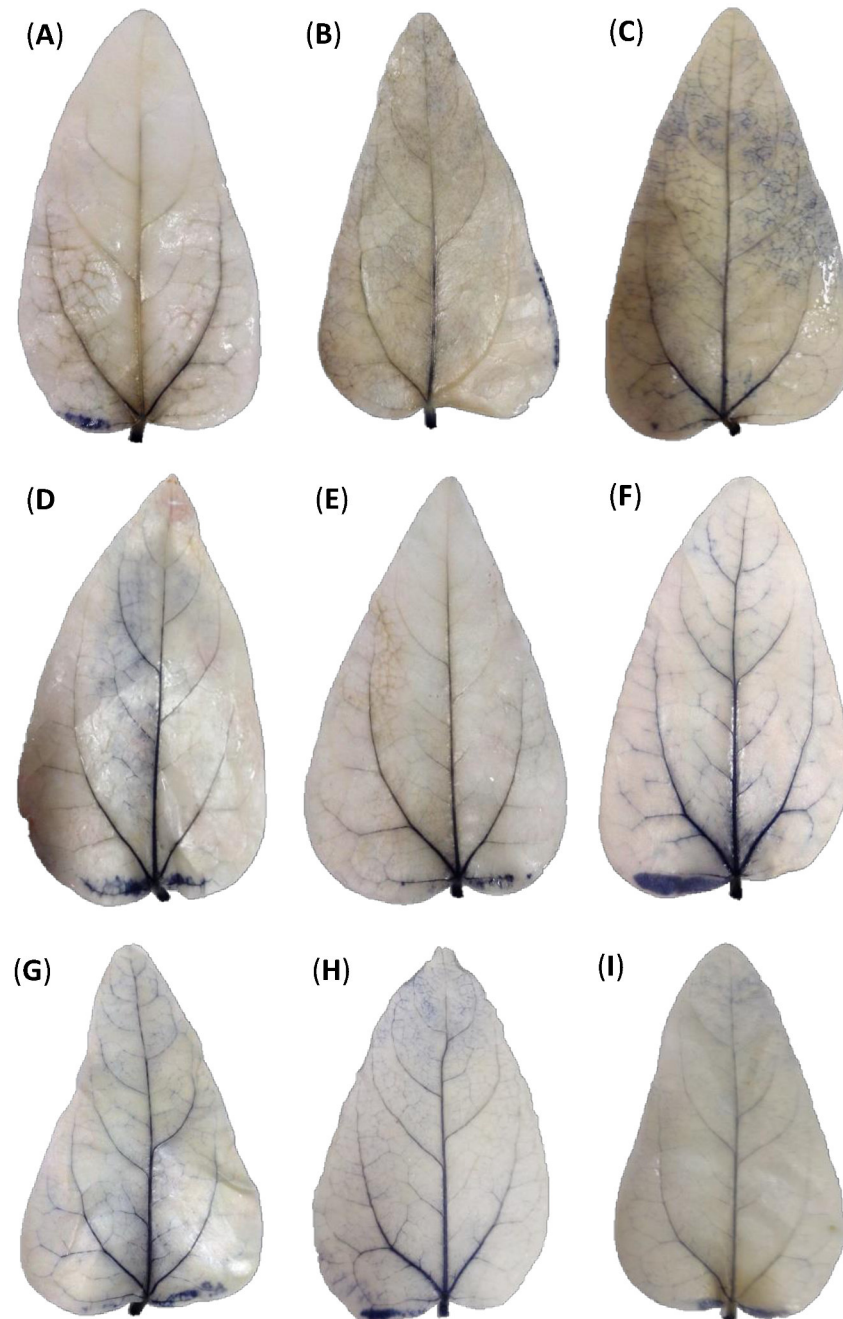
Na tentativa de investigar o envolvimento das EROs no mecanismo de resposta de defesa de feijão-de-corda, genótipo BR 3, ao fungo *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), as plantas foram inoculadas com a suspensão de conídios do *C. gloeosporioides* e a produção de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) avaliada qualitativamente pelo método do NBT, durante a cinética de infecção em 8 diferentes tempos por até 72 horas. O *C. gloeosporioides* foi capaz de induzir a produção de ânion superóxido em folhas primárias de feijão-de-corda, o qual foi claramente visualizado na forma de manchas azuis (**Fig. 4B - I**). A produção de ânion superóxido foi relativamente rápida, sendo detectada nas folhas primárias, 2HAI, quando comparado com o grupo controle. A partir de 2 HAI, foi observado o aparecimento do precipitado de azul de formazana insolúvel na superfície das folhas primárias, resultado também observado 4 HAI. A 8 HAI houve redução da intensidade. Posteriormente, houve novo aumento de intensidade de coloração, com 12 HAI, que se manteve após 24 e 48 HAI, mas com nova redução 72 HAI (**Fig. 4G, H e I**).

### 4.4 Avaliação qualitativa e quantitativa da presença de peróxido de hidrogênio em folhas primárias de feijão-de-corda

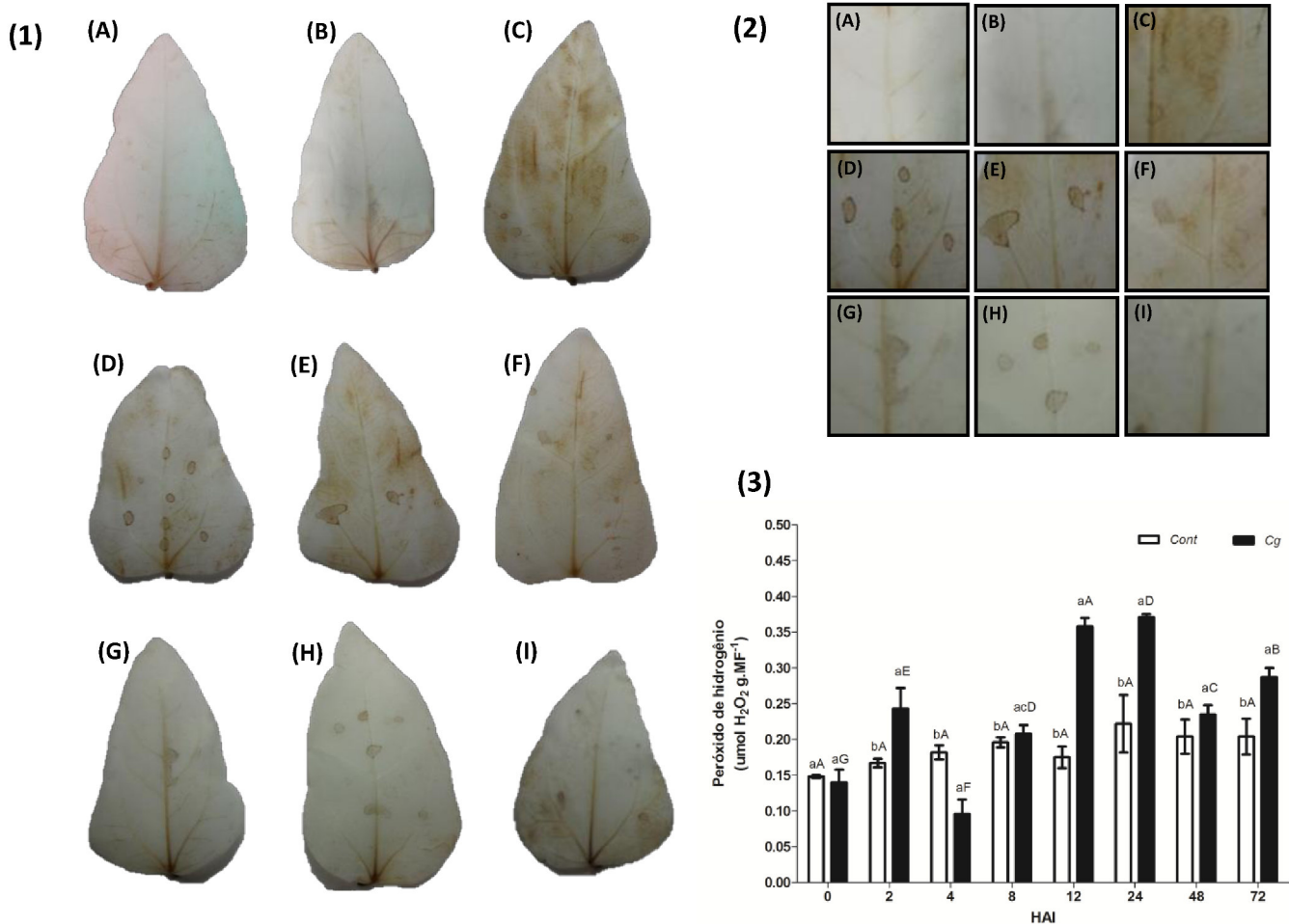
De acordo com a análise qualitativa, houve aumento de produção de peróxido de hidrogênio nos estágios iniciais da infecção pelo *C. gloeosporioides*, ou seja, 2, 4 e 8 HAI em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR3 (**Fig. 5 - 1 C, D e E**). Esse acúmulo foi observado particularmente nos sítios de inoculação do *C. gloeosporioides* e nas laterais da nervura central da folha. Nenhum halo ou manchas castanho-avermelhadas foram observadas nas plântulas controles (**Fig. 5 - 1A**). Como revelado na **Fig. 5 - 2 C, D e E**, houve acúmulo

---

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos sítios de infecção na superfície da folha, que foi detectado pela formação dos halos castanho-avermelhados bem evidentes 4 HAI, apresentando redução da intensidade no decorrer dos tempos (**Fig. 5 - 2 F, G e H**). Análise quantitativa dos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a cinética de infecção mostrou haver geração rápida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 5 - 3**) nas folhas primárias de feijão-de-corda, posto que, 2 HAI, esse teor foi de 0,243 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> massa fresca (MF) (**Fig. 5 - 3**). Em seguida, 4 HAI, esse teor diminuiu (0,096 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MF), mas novo e considerável aumento (0,208 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MF) ocorreu 8 HAI. Contudo, o maior pico de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observado 24 HAI (0,371 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MF). Após esse tempo, foi observada queda nos teores 48 HAI, mas com valores médios sempre maiores quando comparados com àqueles de planta controles (**Fig. 5 - 3**).



**Figura 4.** Acúmulo de ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides*. (A): folha controle; (B): 0 hora após infecção (HAI); (C): 2 HAI; (D): 4 HAI; (E): 8 HAI; (F): 12 HAI; (G): 24 HAI; (H): 48 HAI; (I): 72 HAI. Zonas de coloração azul representam regiões onde houve acúmulo de ânion superóxido.



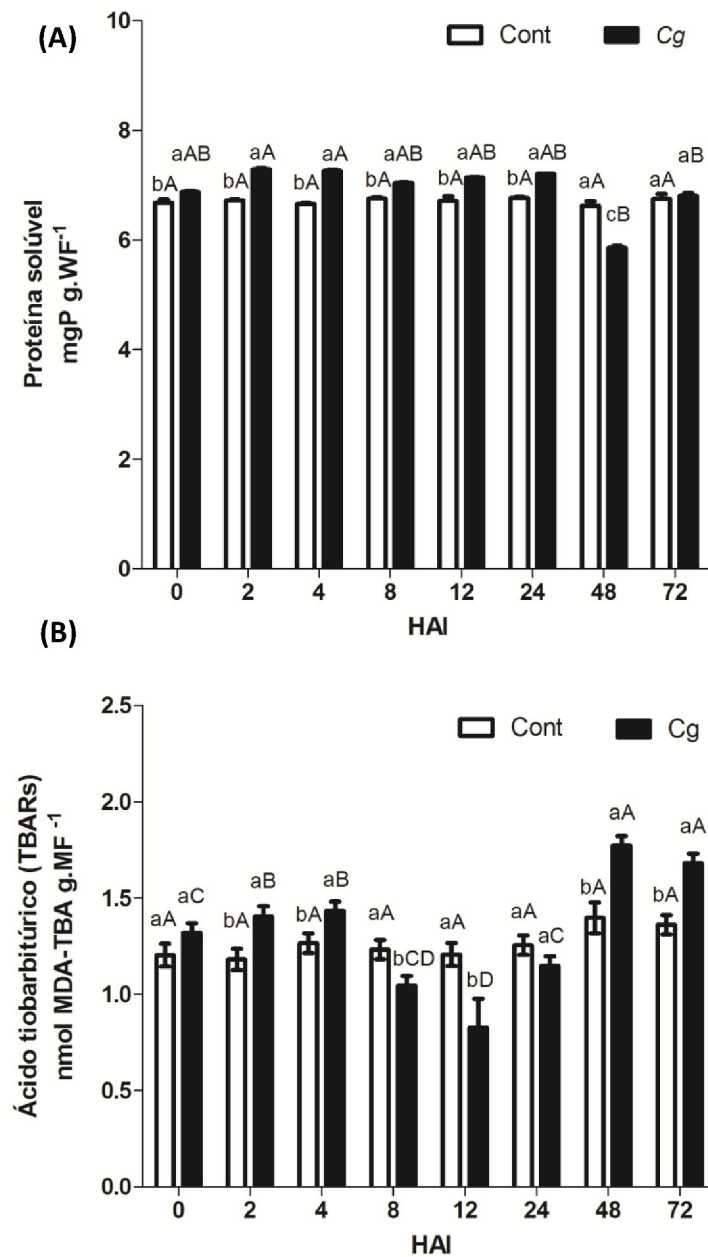
**Figura 5.** Presença e teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculadas com *C. gloeosporioides*. (A): folha controle; (B): 0 HAI; (C): 2 HAI; (D): 4 HAI; (E): 8 HAI; (F): 12 HAI; (G): 24 HAI; (H): 48 HAI; (I): 72 HAI. (1) – Visão geral das folhas primárias despigmentadas mostrando a cinética de infecção de *C. gloeosporioides* e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (2) – destaque do sítio de infecção mostrando o halo castanho-avermelhado onde houve acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (3) – Teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante os tempos iniciais de infecção. *Cont*: amostras controles *Cg*: amostras inoculadas. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias (Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre as médias dentro do mesmo tratamento. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos diferentes tratamentos em cada tempo.



---

#### 4.5 Conteúdos de proteínas solúveis e teor de peroxidação de lipídeos

O fungo *C. gloeosporioides* foi capaz de induzir a produção de EROs em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3. Quando produzido em excesso, as EROs podem reagir, indiscriminadamente, com diversas moléculas, dentre as quais proteínas e lipídeos de membrana, produzindo modificações qualitativas e quantitativas. Dessa forma, a quantificação de proteínas solúveis foi investigada nos extratos de folhas primárias de feijão-de-corda, com o intuito de avaliar possíveis alterações. Durante a cinética de infecção, houve apenas redução ( $5,8 \text{ mgP g}^{-1} \text{ MF}$ ) às 48 HAI, em comparação ao valor médio encontrado para o grupo de plantas controles ( $6,6 \text{ mgP g}^{-1} \text{ MF}$ ), nesse tempo (**Fig. 6A**). Já a peroxidação lipídica, estimada pelos conteúdos de TBARs apresentaram diferenças significativas desde 2 HAI e 4 HAI (**Fig. 6B**). Após esses tempos, houve redução entre 8 e 12 HAI, para depois haver novo aumento, significativo, de TBARs, 48 e 72 HAI, em comparação com os respectivos controles (**Fig. 6B**).

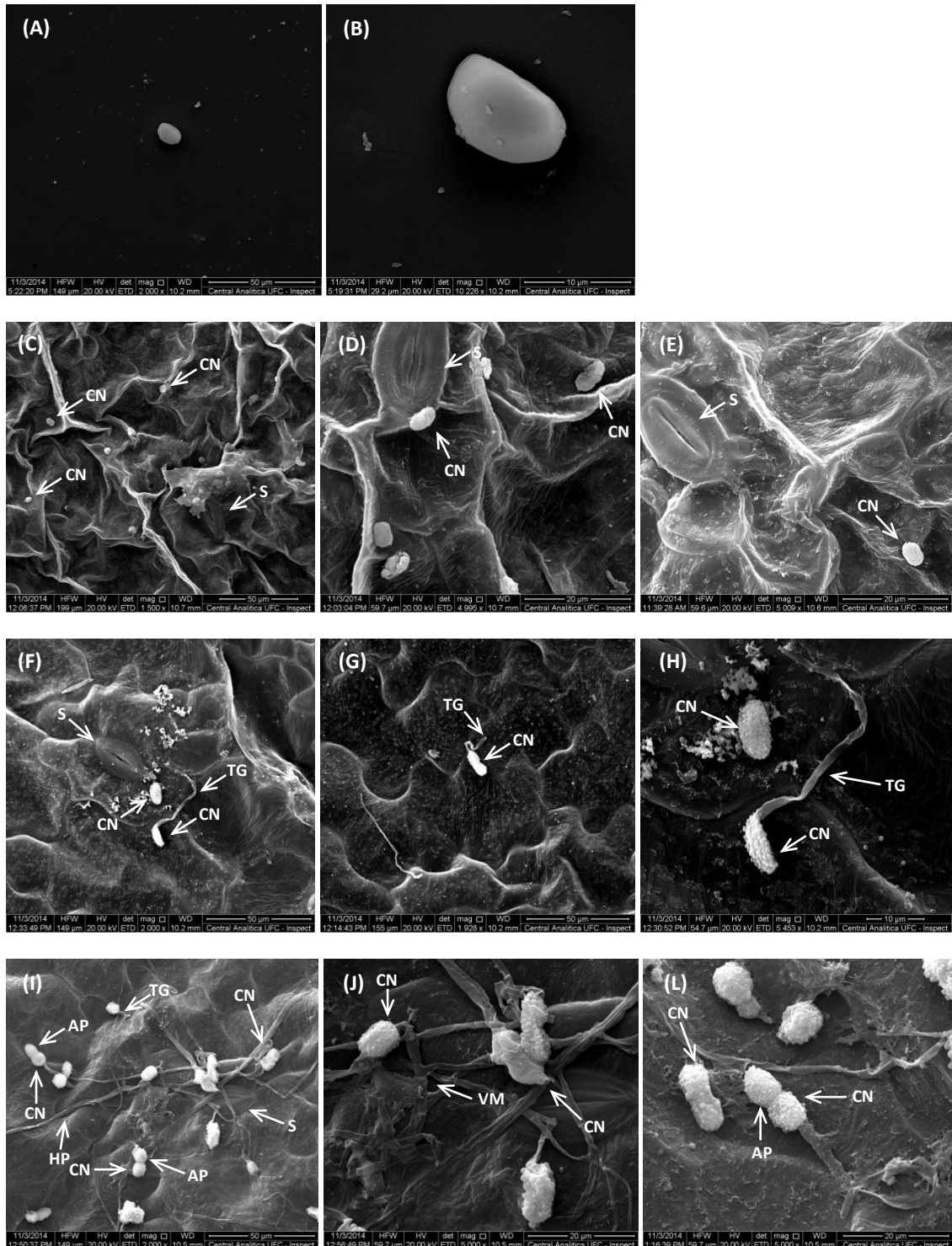


**Figura 6.** Teor de proteína (A) e de TBARS (B) em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, inoculado com *C. gloeosporioides*. Cont: Plantas controles; Cg: plantas inoculadas. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias (Turkey,  $\rho \leq 0,05$ ). Letras maiúsculas representam diferenças entre as médias dentro do mesmo tratamento. Letras minúsculas representam comparações entre as médias dos diferentes tratamentos em cada tempo.

#### 4.6 Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para acompanhar a cinética de infecção do feijão-de-corda pelo fungo, bem como possíveis modificações ultraestruturais, MEV, foi também, utilizada. Os conídios de *C. gloeosporioides* observados isoladamente, sobre lâmina de vidro, apresentaram-se ovais, com comprimento de 10  $\mu\text{m}$  e superfície lisa (**Fig. 7A e B**). Na superfície de folhas primárias observadas 4 HAI, os conídios já se apresentavam aderidos à cutícula e dispostos bem próximos aos estômatos (**Fig. 7C, D e E**). 8 HAI, os conídios germinaram e formaram longos tubos germinativos sobre a superfície foliar (**Fig. 7F, G e H**). Nesse estágio, também foram observadas modificações quanto ao aspecto morfológico da superfície dos conídios, que se apresentaram irregulares. Apesar das modificações, o fungo *C. gloeosporioides* conseguiu progredir em seu crescimento sobre a superfície das folhas primárias, 12 HAI, com formação de apressórios, apesar das alterações morfológicas na superfície dos conídios (**Fig. 7I**). O desenvolvimento foi acompanhado da formação de hifas primárias, que tomaram a superfície das folhas da planta hospedeira, e de vesículas multilobadas (**Fig. 7J e L**). O processo de disseminação das hifas sobre a superfície foliar ficou bem evidenciado 24 HAI, apesar de não ser visualizada tentativa de penetração indireta na planta, através dos estômatos (**Fig. 8A e B**). 24 HAI houve formação de hifas de penetração que evidenciaram a tentativa de infecção direta na célula hospedeira (**Fig. 8C**). Apesar do desenvolvimento das hifas primárias de *C. gloeosporioides* sobre a superfície das células hospedeiras e da tentativa de penetração direta, o que se observou 48 HAI foi deformação das hifas formadas, bem como, parte dos conídios (**Fig. 8D, E e F**). Esses resultados foram confirmados 72 HAI, quando os conídios se apresentaram

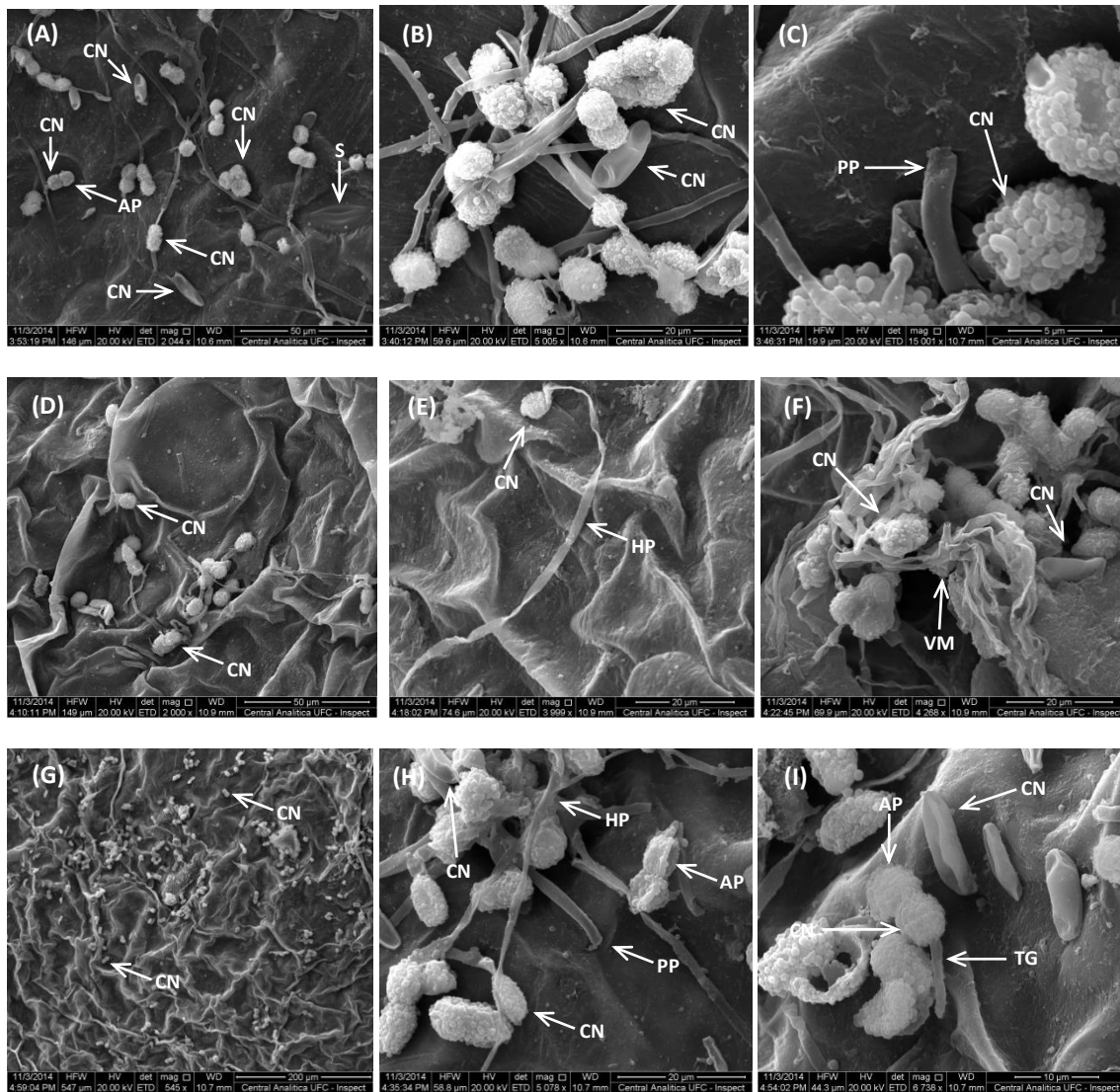
irregulares, com a estrutura deformada e outros muitos que não conseguiram nem germinar (Fig. 8G, H e I).



**Figura 7.** Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visualizado por microscopia eletrônica de

---

varredura (MEV). **(A)** e **(B)**: conídios (**CN**) isolados de *C. gloeosporioides*, sobre a superfície de uma lâmina de vidro. **(C)**, **(D)** e **(E)**: conídios aderidos sobre a superfície das folhas primárias de feijão-de-corda, próximo aos estômatos (**S**), 4 HAI. **(F)**, **(G)** e **(H)**: conídios germinados, emitindo o tubo germinativo (**TG**) e aderidos sobre a superfície das folhas primárias, próximo aos estômatos (**S**), 8 HAI. **(I)**, **(J)** e **(L)**: Disseminação das hifas sobre a superfície das folhas 12 HAI. **(HP)**: hifas primárias, **(AP)**: apressórios e **(VM)**: vesícula multilobada.



**Figura 8.** Cinética de infecção das folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides*, visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A), (B) e (C): Disseminação das hifas sobre a superfície das folhas primárias, 24 HAI, sendo evidenciada a tentativa de penetração direta do fungo na superfície da folha por meio de sua hifa de penetração (PP). (D), (E) e (F): conídios (CN) germinados emitindo o tubo germinativo (TG) e aderidos sobre a superfície das folhas primárias, 48 HAI, sendo evidenciada a vesícula multilobada (VM). (G), (H) e (I): Disseminação de hifas primárias (HP) e ocorrência de vesícula multilobada (VM), 72 HAI. Detalhe da estrutura dos conídios totalmente deformados (I).

---

#### **4.7 Perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo antioxidante de feijão-de-corda, genótipo BR 3, em resposta a infecção pelo fungo *C. gloeosporioides*.**

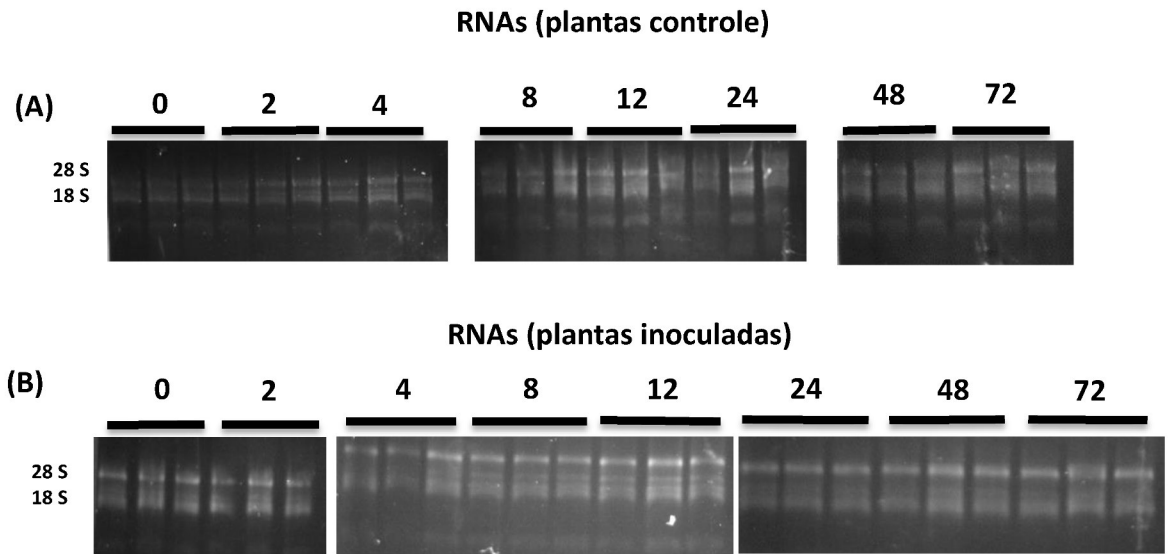
##### **4.7.1 Teor e integridade do RNA extraído avaliado por eletroforese em gel de agarose**

Na quantificação dos RNAs extraídos de folhas primárias de feijão-de-corda, os resultados mostraram que as relações de absorbâncias entre 260/280 e 260/230 para o grupo controle, não inoculado, apresentaram médias de 2,1 e 1,5 respectivamente, e média de concentração de RNA total de 188  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  (**Tab. 2**). Já no grupo inoculado com o fungo, as relações 260/280 e 260/230 ficaram com médias de 2,1 e 1,6, respectivamente, e média de concentração de RNA total de 99,5  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  (**Tab. 2**). Os RNAs extraídos apresentaram ausência de contaminação com DNA genômico, de acordo com o teste realizado com os iniciadores para os genes *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII*, cujo desenho não foi realizado na junção éxon-éxon (**Anexo 2**). Em relação à integridade dos RNAs, os perfis obtidos após eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostraram não haver fragmentação considerável das bandas de RNA ribossomal referentes às subunidades 18S e 28S (**Fig. 9A e B**). A qualidade do cDNA obtido, de todas as amostras, após reação de PCR convencional, usando como gene constitutivo o fator de alongação 1 beta (*EF1 $\beta$* ), mostrou uma banda referente ao fragmento amplificado (*amplicon*) do gene *EF1 $\beta$* , sugestivo da boa qualidade e viabilidade dos cDNAs produzidos (**Fig. 10A e B**).

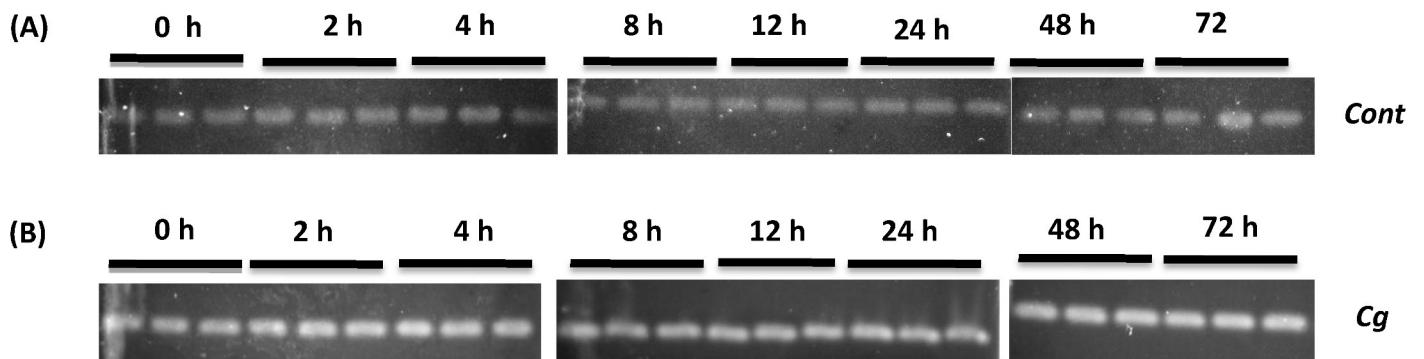
**Tabela 2.** Valores médios das concentrações e relações de absorvâncias dos RNAs extraídos de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, controle e inoculado com *C. gloeosporioides*

Horas após inoculação (hai)	Concentração (ng/ $\mu$ L)		Relação (260/280 nm)		Relação (260/230 nm)	
	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado
0	120,50	88,75	2,15	2,11	1,33	1,88
0	164,80	61,45	2,12	2,10	1,74	1,81
0	193,50	74,60	2,13	2,14	2,17	0,77
2	162,40	70,50	2,12	2,08	1,79	0,83
2	141,40	75,55	2,16	2,02	1,00	1,00
2	161,80	67,45	2,12	2,09	0,70	0,52
4	120,00	79,10	2,09	2,11	2,03	0,87
4	162,80	127,00	2,11	2,11	1,23	2,14
4	94,20	98,65	2,08	2,11	1,20	1,81
8	86,26	77,70	2,10	2,16	1,35	2,05
8	130,43	90,85	2,11	2,16	0,62	2,18
8	204,36	105,50	2,12	2,17	1,09	2,31
12	269,00	85,30	2,13	2,18	2,26	2,24
12	238,00	126,20	2,12	2,17	2,11	1,68
12	198,00	102,35	2,09	2,12	1,55	1,13
24	138,33	88,85	2,14	2,20	0,49	1,93
24	221,30	103,90	2,13	2,17	2,13	2,03
24	265,06	93,40	2,17	2,17	2,15	1,66
48	347,76	134,85	2,13	2,16	1,90	2,26
48	168,76	128,90	2,11	2,17	1,31	1,01
48	192,03	149,10	2,11	2,17	1,90	1,69
72	263,13	101,90	2,11	2,18	2,05	1,79
72	270,26	155,05	2,11	2,16	1,66	1,98
72	200,00	101,95	2,12	2,17	1,40	0,92





**Figura 9.** Integridade dos RNAs extraídos de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, visualizado em gel de agarose (1,5%), evidenciando as bandas do RNA ribossomal 18S e 28S. RNAs extraídos nos tempos de 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após inoculação (HAI) de plantas controles (A) e inoculadas (B) com *C. gloeosporioides*.

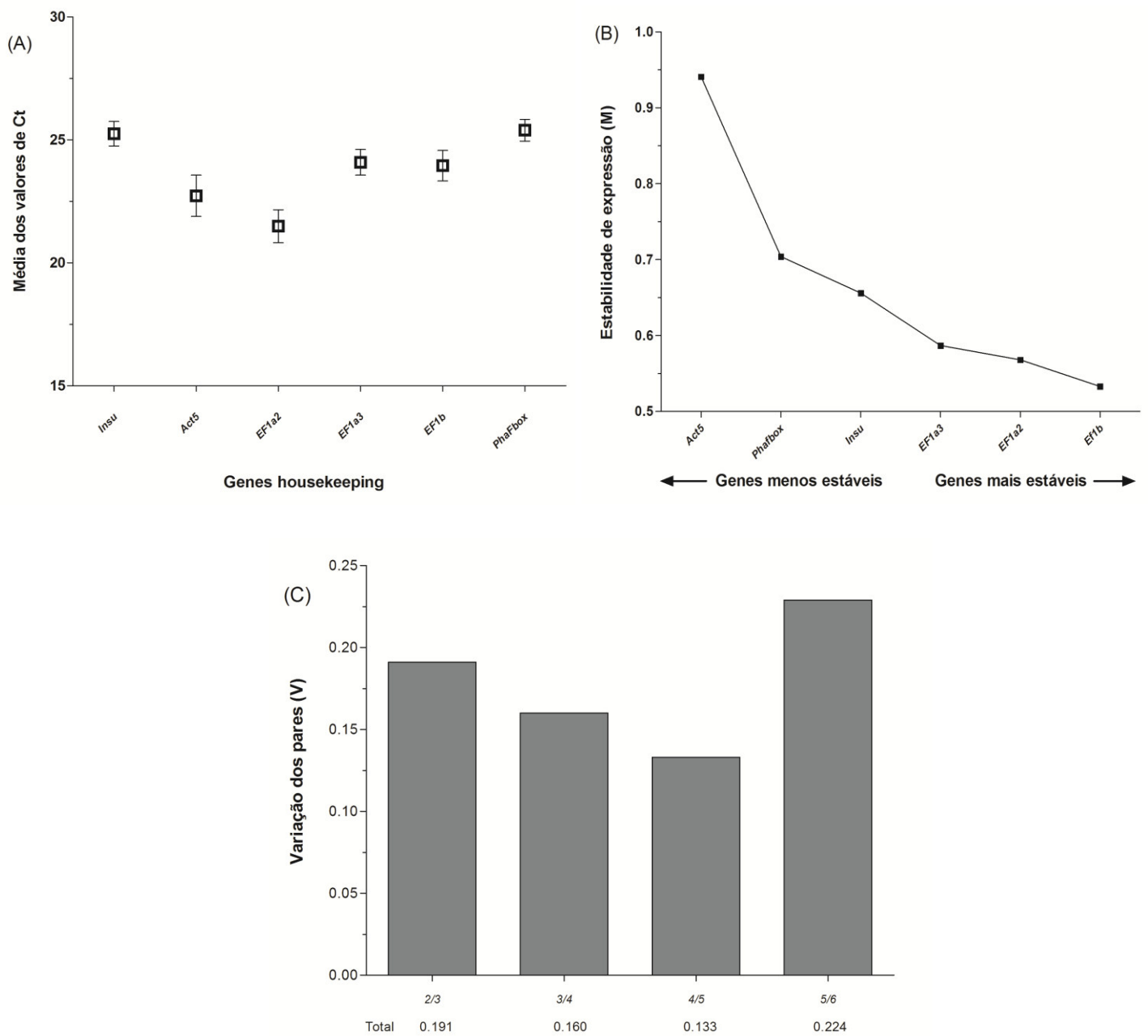


**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose (1,5%) dos produtos de amplificação do gene do fator de alongação 1 beta (*EFL1 $\beta$* ), para avaliação da qualidade do cDNA produzido nas reações de PCR convencional de amostras oriundas de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, em 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após inoculação (HAI) com *C. gloeosporioides*. **(A)**: produtos de PCR de plantas controles (Cont). **(B)**: produtos de PCR de plantas inoculadas (Cg).

---

#### 4.7.2 Normalização dos genes de referência por RT-qPCR

Nos experimentos de RT-qPCR, as médias dos valores de *Ct* dos genes de referência obtidos em todos os tempos experimentais de plantas controles e inoculadas variaram de 21,49 a 25,29 (**Fig. 11A**). O gene *EF1a2* apresentou o menor *Ct* sendo o mais expresso, enquanto que o gene *PhaFbox* foi o menos expresso. Quanto à média de estabilidade de expressão (M) o gene *EF1β* foi o mais estável, enquanto que o gene *Act5* o menos estável (**Fig. 11B**). De acordo com o programa GeNorm, a média de estabilidade de expressão (M) de todos os conjuntos de genes analisados deve ficar abaixo do valor limite definido de 0,15, considerado como valor de referência com expressão estável. De acordo com os resultados, a adoção dos 4 genes mais estáveis, ou seja, *Insu*, *EF1a2*, *EF1a3*, *EF1b* (relação 4/5), foi a relação suficiente na qual o valor de variação dos pares (V) ficou abaixo de 0,15 sendo ideal para normalização dos dados (**Fig. 11C**).



**Figura 11.** Valores médios dos limiares de detecção (*Ct*) (A), média de estabilidade de expressão (*M*) (B), e variação dos pares de genes (*V*) (C) para *Insu*, *Act5*, *EF1a2*, *EF1a3*, *EF1b* e *PhaFbox*, obtidos a partir dos cDNAs de 48 amostras de plantas controles e inoculadas. (A) Os valores de *Ct* são calculados através da quantificação do número de ciclos *Ct* na reação de qPCR. Barra em (A): desvio padrão da média.

#### 4.7.3 Expressão dos genes alvos envolvidos no metabolismo antioxidante de feijão-de-corda, genótipo BR 3, em resposta à infecção pelo *C. gloeosporioides*

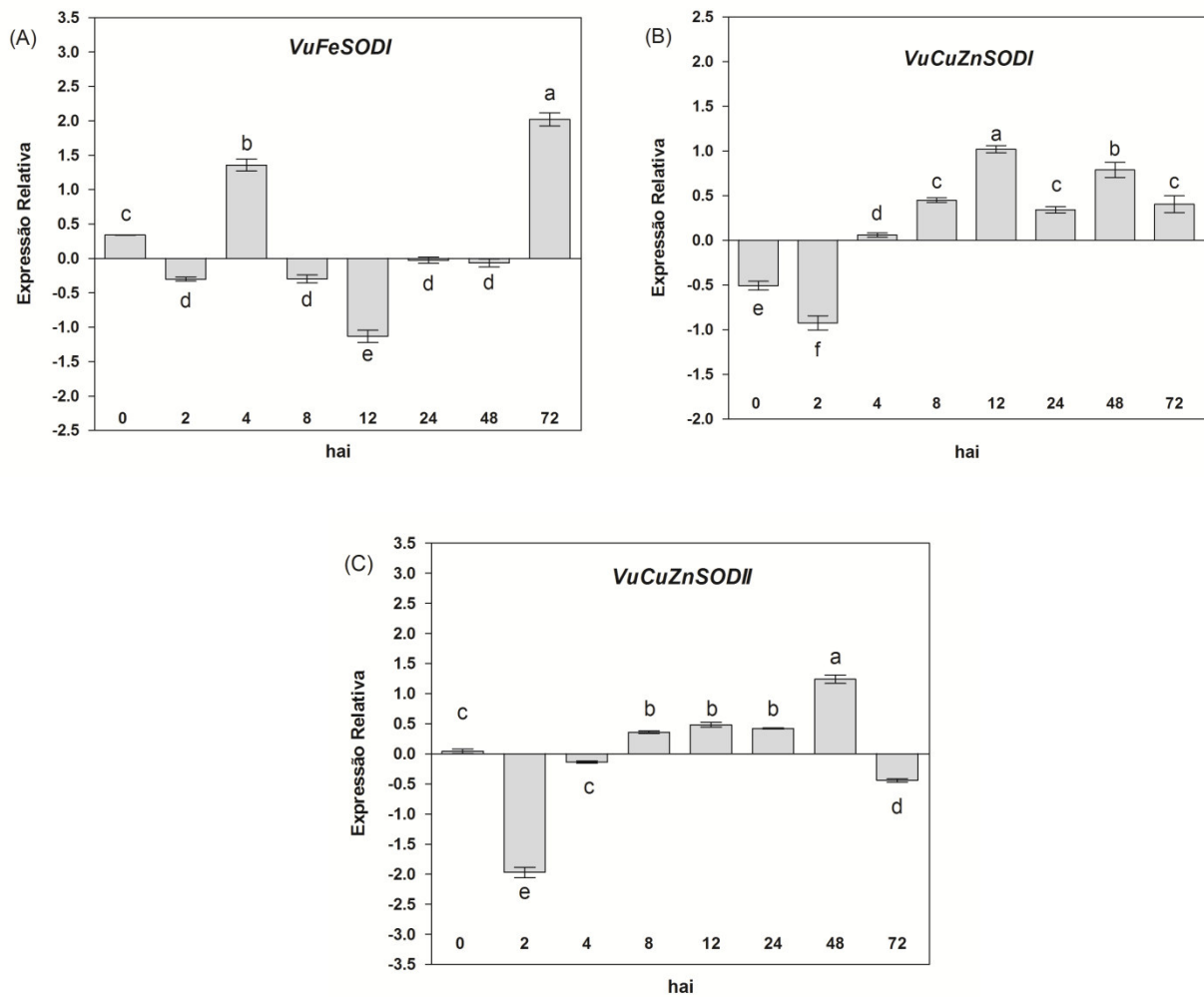
Análise dos transcritos dos 14 genes alvos, *VuFeSODI*, *VuCuZnSODI*, *VuCuZnSODII*, *VuAPXI*, *VuCATI*, *VuCATII*, *Vu1Cysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*, *VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII*, todos envolvidos no metabolismo antioxidante, foi realizado em plantas controles e inoculadas, em 8 tempos distintos, durante as primeiras 72 horas de infecção. Análise da cinética de expressão dos transcritos para o gene *VuFeSODI*, mostrou haver inibição na maioria dos tempos estudados, ou seja, em 2, 8, 12, 24 e 48 HAI, mas expressão significativa 4 HAI e 72 HAI (**Fig. 12A**). Para *VuCuZnSODI*, houve forte repressão 2 HAI, com posterior aumento de expressão 4, 8 e 12 HAI, sendo, nesse último tempo, mais representativo (**Fig. 12B**). Apesar da redução da expressão 24 e 72 HAI, *VuCuZnSODI* teve um novo pico de expressão 48 HAI (**Fig. 12B**). De forma similar ao gene da *VuCuZnSODI*, o gene da *VuCuZnSODII* apresentou uma repressão dos transcritos 2 HAI. Posteriormente, os níveis dos transcritos de *VuCuZnSODII* acumularam-se no decorrer da cinética de infecção até 48 HAI, apresentando uma significativa redução, 72 HAI (**Fig. 12C**).

Quanto aos genes que codificam proteínas envolvidas com o metabolismo de remoção do peróxido de hidrogênio, observou-se o envolvimento importante dos genes das catalases *VuCATI* e *VuCATII*, peroxirredoxinas *VuPrxIIBCD* e *VuPrxIIE* e um menor envolvimento do gene da *VuApxI* (**Fig. 13 e 14**). Os níveis dos transcritos da *VuApxI* apresentaram-se subexpressos até 8 HAI. Entretanto, 12 HAI, *VuApxI* demonstrou considerável aumento do nível dos transcritos, mantendo-se elevado até 72 HAI (**Fig. 13A**). Quanto aos genes da *VuCATI* e *VuCATII*, estes apresentaram perfil transcricional bastante similares, apesar do gene da *VuCATII* ser mais expresso que o gene da *VuCATI*. Ambos os genes apresentaram uma forte repressão de expressão dos transcritos 2 HAI (**Fig. 13B e C**).

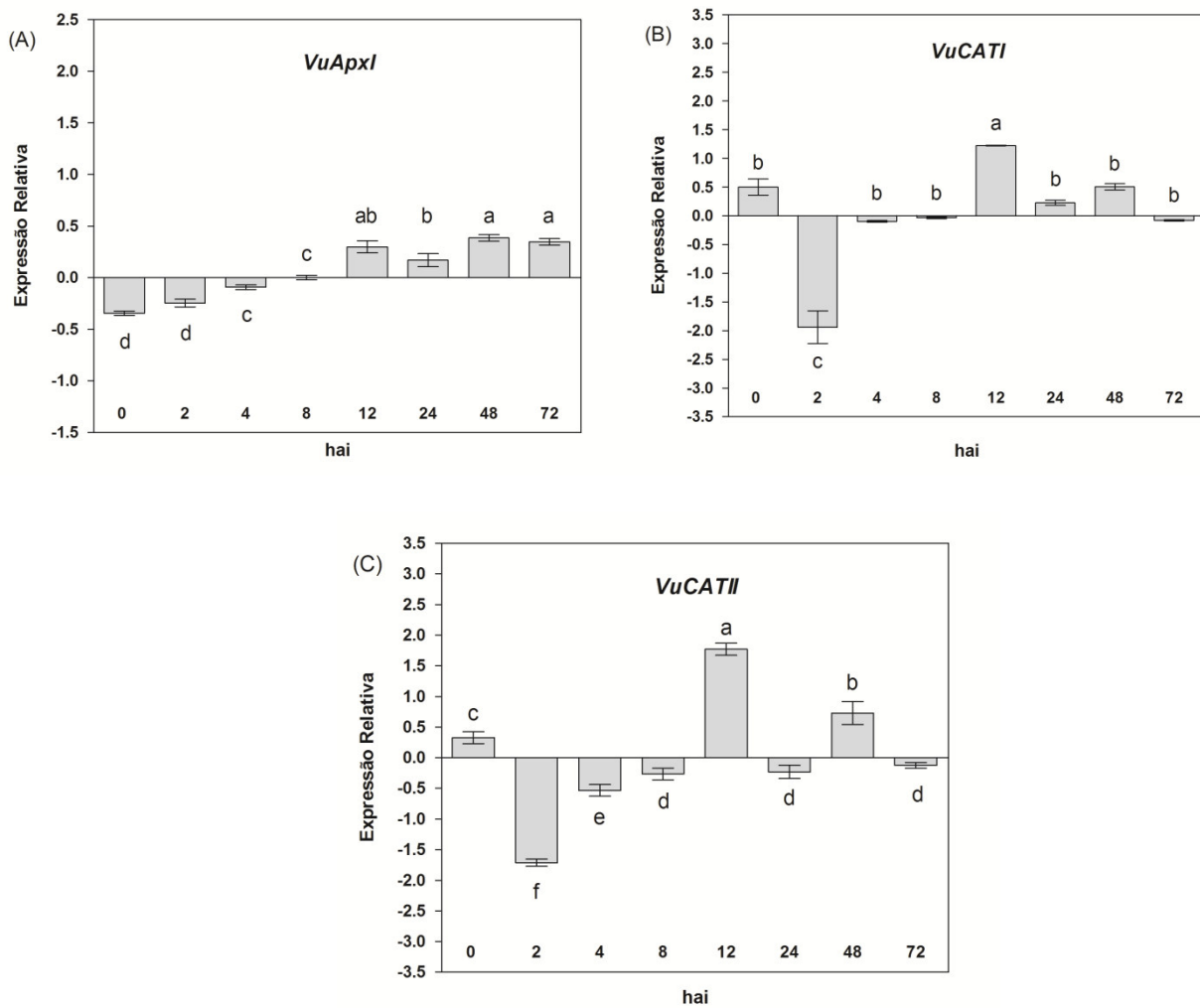
---

Contudo, os transcritos para ambas os genes da catalase, começaram a demonstrar um aumento dos níveis 4, 8 e apresentando um pico evidente 12 HAI (**Fig. 13B e C**). Apesar da redução dos níveis dos transcritos 24 HAI, ambos os genes *VuCATI* e *VuCATII* apresentaram um novo aumento de expressão 48 HAI (**Fig. 13B e C**).

Com relação à família multigênica das peroxirredoxinas, foram analisados oito genes que codificam para isoformas com funções sítio específicas. De acordo com o resultado, *Vu1Cysprx* foi o gene menos expresso entre todas as PRXs analisadas, demonstrando subexpressão dos transcritos 8 e 24 HAI (**Fig. 14A**). Os genes *Vu2CysprxA* e *Vu2CysprxB* apresentaram perfil de expressão similar, demonstrando pequenas variações de expressão durante a cinética de infecção (**Fig. 14B e C**) sendo reprimidos 12 HAI (**Fig. 14B e C**). De forma interessante, os transcritos do gene da peroxirredoxina *VuPrxQ*, foi inibido 2 HAI com *C. gloeosporioides*, e manteve-se reprimido até 24 HAI, onde houve um sutil aumento dos níveis 48 e 72 HAI (**Fig. 14D**). O gene da *VuPrxIIBCD*, demonstrou forte expressão dos transcritos nas primeiras 2 HAI, com redução 4 HAI, atingindo níveis próximo ao controle 8 HAI (**Fig. 14E**). Posteriormente, *VuPrxIIBCD* apresentou um novo pico de expressão dos transcritos 72 HAI (**Fig. 14E**). A expressão dos transcritos do gene *VuPrxIIE* apresentou uma forte inibição nas primeiras 2 HAI, com posterior aumento de expressão 24 e 48 HAI (**Fig. 14F**). Para o gene da *VuPrxIIFI* não houve alteração de expressão dos transcritos nas primeiras 4 HAI sendo a expressão dos transcritos reprimida 8, 24 e 72 HAI (**Fig. 14G**). Já a expressão dos transcritos do gene da *VuPrxIIFII* não demonstrou qualquer alteração durante toda a cinética de interação entre feijão-de-corda e o *C. gloeosporioides* (**Fig. 14H**).

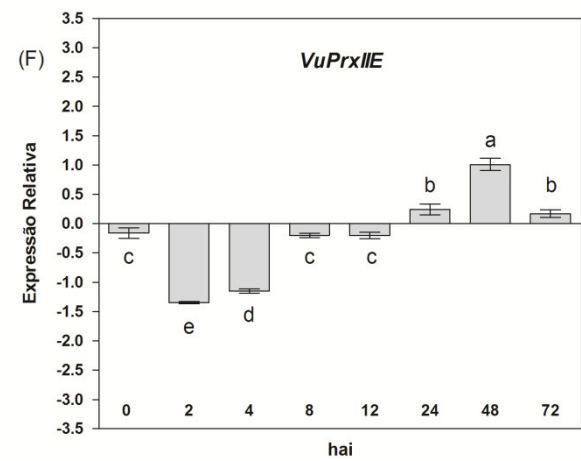
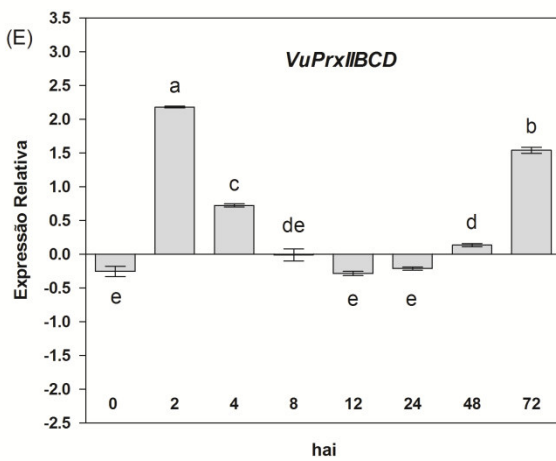
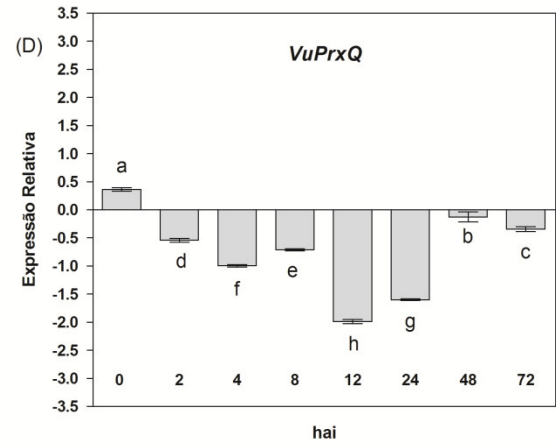
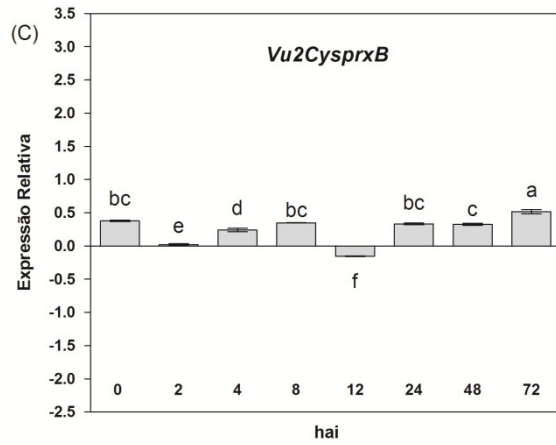
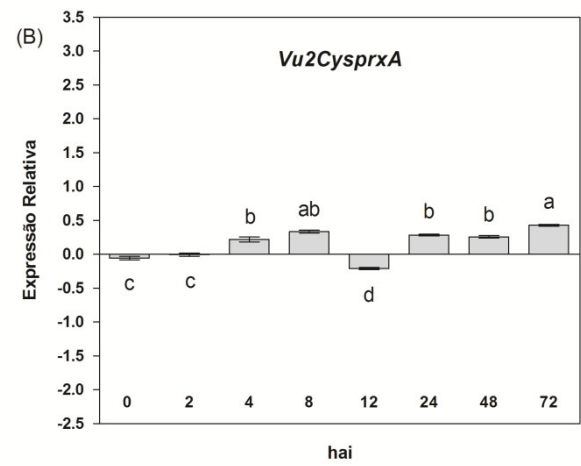
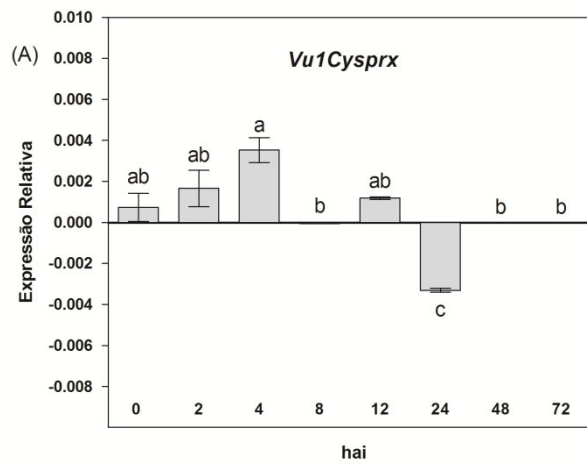


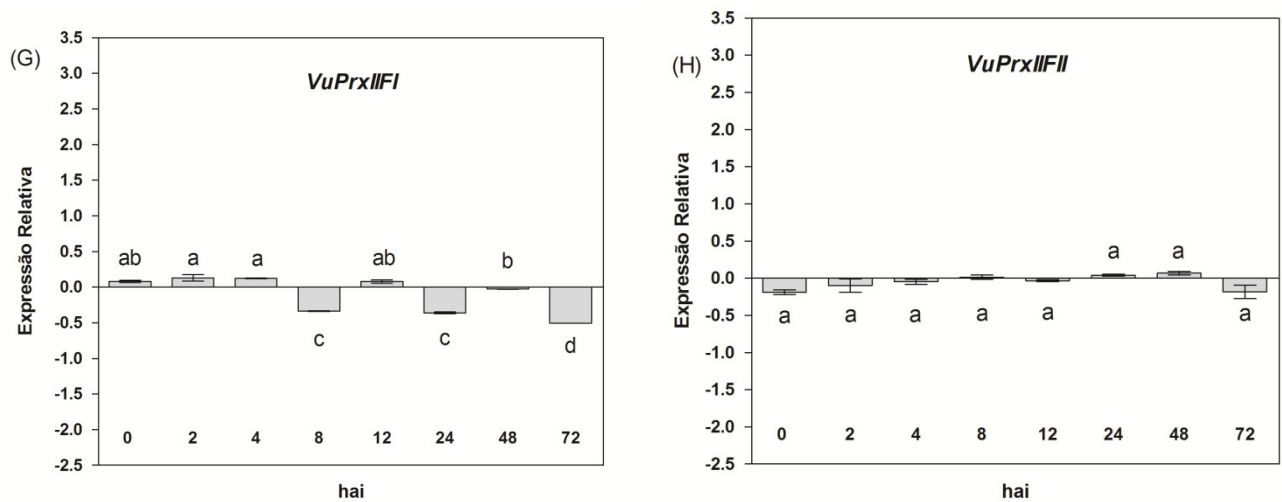
**Figura 12.** Expressão relativa dos genes associado ao metabolismo redox *VuFeSODI*, *VuCuZnSODI* e *VuCuZnSODII* em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com *C. gloeosporioides* em relação a folhas primárias tratadas com água destilada estéril (controles). Os resultados representam as médias da triplicata biológica obtida a partir de três experimentos independentes. As médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 13.** Expressão relativa dos genes associado ao metabolismo redox *VuAPXI*, *VuCATI*, *VuCATII*, em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com *C. gloeosporioides* em relação a folhas primárias tratadas com água destilada estéril (controles). Os resultados representam as médias da triplicata biológica obtida a partir de três experimentos independentes. As médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).







**Figura 14.** Expressão relativa dos genes associado ao metabolismo redox *VuIcysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*, *VuPrxIIF1*, *VuPrxIIF2*, em folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com *C. gloeosporioides* em relação a folhas primárias tratadas com água destilada estéril (controles). Os resultados representam as médias da triplicata biológica obtida a partir de três experimentos independentes. As médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa (Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

---

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Interação entre o feijão-de corda, genótipo BR 3, e *C. gloeosporioides* (Isolado LPVD-1)

A resistência ou susceptibilidade de plantas a patógenos é governada por características genéticas, como a presença ou ausência de genes de resistência na planta hospedeira, e genes de avirulência no patógeno (DODDS *et al.*, 2006). Essas características genéticas conferem a resistência de plantas e são dependentes de uma série de fatores, dentre os quais o reconhecimento da invasão e um rápido e efetivo mecanismo de resposta de defesa. Conídios do fungo hemibiotrófico *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) rapidamente se desenvolveram sobre a superfície de folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, aderindo à cutícula, próximo aos estômatos e nervuras (**Fig. 3B**). 8 HAI houve formação do tubo germinativo que se desenvolveu sobre a superfície da folha (**Fig. 3C e D**). 12 HAI houve formação de apressórios (**Fig. 3E**), com extensiva disseminação do *C. gloeosporioides* sob a superfície das folhas, com desenvolvimento de hifas primárias (**Fig. 3F**), bem como, tentativa de infecção direta na célula hospedeira (**Fig. 8C**). Apesar da tentativa de infecção, *C. gloeosporioides* não foi capaz de gerar hifas secundárias e induzir lesões necróticas sobre a superfície das folhas primárias (**Fig. 2**). Esses dados são similares ao observado com um cultivar resistente de *Benincasa hispida*, no qual, apesar do rápido desenvolvimento do *Colletotrichum Legenarium*, sintomas característicos da doença antracnose não foram visíveis a olho nu (GE; GUEST, 2011). Assim, foi confirmada que a relação entre o *C. gloeosporioides* (Isolado LPVD-1) e o feijão-de-corda, genótipo BR 3, é do tipo incompatível, como mostrado previamente em nosso laboratório (MOURA *et al.*, 2014). Apesar da ausência de sintomas característicos da antracnose, o feijão-de-corda, genótipo BR 3, foi capaz de reconhecer a presença do *C. gloeosporioides* sobre a superfície das folhas primárias e induzir respostas de defesa como a explosão oxidativa, que foi caracterizada pela

---

produção e acúmulo de EROs como ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (**Fig. 4 e 5**). As EROs podem exercer múltiplas funções no mecanismo de defesa contra patógenos, podendo atuar diretamente sobre os microrganismos invasores, no sítio de tentativa de infecção, na lignificação e reforço de parede celular, induzir morte celular programada e atuar como molécula sinalizadora de respostas de defesa (LEHMANN *et al.*, 2015). Entretanto, há relatos de que a produção de EROs poderia ser benéfica a patógenos necrotróficos que tiram vantagens ao se desenvolver sobre tecidos mortos (HORBACH *et al.*, 2011). Assim, a função das EROs variam de acordo com o estilo de vida e da fase de desenvolvimento do patógeno. Na interação com o patógeno hemibiotrófico *C. gloeosporioides*, o genótipo BR 3 de feijão-de-corda foi capaz de reconhecer o patógeno e produzir o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) já 2 HAI, com um rápido aumento da produção 12 HAI (**Fig. 4C**). Em plantas, a formação do radical  $O_2^{\bullet -}$  é um mecanismo inicial chave de resistência dentro do evento da explosão oxidativa. Nesse contexto, a produção de  $O_2^{\bullet -}$  está associada a uma oxidase dependente de NADPH presente na membrana da célula vegetal e responsiva ao ataque de patógenos (SAGI; FLUHR, 2001; PEREZ; BROWN, 2014). A produção de  $O_2^{\bullet -}$  em resposta à infecção destaca-se como um mecanismo importante de defesa do feijão-de-corda contra *C. gloeosporioides*. Em plantas, o radical  $O_2^{\bullet -}$  pode ser eventualmente dismutado em um passo subsequente por enzimas denominadas de dismutases do superóxido, produzindo  $H_2O_2$  a  $O_2$  (MILLER *et al.*, 2010). O  $H_2O_2$  destaca-se como uma das EROs mais quimicamente estável e relacionada a eventos de defesa. Em plantas, outra via produtora de  $H_2O_2$  está relacionada a oxidases presentes no apoplasto como oxidases do oxalato e oxidases de amina (WALTERS, 2003; APEL; HIRT, 2004; MITTLER *et al.*, 2004). Na interação com o feijão-de-corda, o fungo *C. gloeosporioides* foi capaz de induzir rápida produção e acúmulo de  $H_2O_2$  nas folhas primárias durante as 12 horas iniciais da cinética de infecção (**Fig. 5**). Na análise qualitativa, um maior acúmulo de peróxido de hidrogênio foi observado nos estágios

---

iniciais (2, 4 e 8 HAI) pós-infecção, particularmente nos sítios de inoculação e nas laterais da nervura central da folha (**Fig. 5. 1 - C, D e E**). Na análise quantitativa, o acúmulo desse radical se deu 2 e 12 HAI com elevados teores (**Fig. 5. 3**). Estudos recentes com feijão-de-corda, genótipo TE 97 411, demonstraram que sua resistência ao *C. gloeosporioides* estava associada ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com 48 HAI (BARRETO *et al.*, 2007). Posteriormente, foi evidenciado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem papel de defesa importante no feijão-de-corda, genótipo TE 97 411, particularmente nos períodos iniciais da interação com *C. gloeosporioides*, pois foi observado elevado acúmulo já nas primeiras 12 horas da infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2014). De forma semelhante, o alto nível de resistência de três espécies de morango (*Duchesnea indica*, *D. chrysantha* e *Potentilla tucumanensis*) ao *C. gloeosporioides* está associado ao acúmulo de peróxido de hidrogênio foliar (PRADO *et al.*, 2012). Esses dados estão de acordo com obtido para o feijão-de-corda, genótipo BR 3, pois foi experimentalmente mostrado o elevado acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas horas iniciais de infecção. De fato, é bem relatado o papel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na interação com fungos hemibiotróficos durante a fase biotrófica de desenvolvimento. Como demonstrado no cultivar resistente de *Theobroma cacao*, ocorre acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sistema vascular, que está associado à resistência contra o fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa* (DIAS *et al.*, 2011). Contudo, esse padrão não é comum a todos os fungos com estilo de vida hemibiotrófico. Embora o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja bastante importante durante a fase biotrófica, outros patógenos hemibiotróficos se beneficiam do seu acúmulo. Esse fato foi observado em plantas de *Brassica napus*, cujas folhas tratadas com catalase (2000 U/mL), enzima decompositora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentaram menores lesões necróticas produzidas pelo fungo hemibiotrófico *Leptosphaeria maculans*, quando comparadas com folhas tratadas com 4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (JINDRICHOVÁ *et al.*, 2011). Na interação do feijão-de-corda, genótipo BR 3, com *C. gloeosporioides*, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> funciona, como indicado experimentalmente, como uma EROS que impede a progressão da infecção durante a

---

fase biotrófica. Analisando a cinética de geração de  $H_2O_2$ , ela se apresenta bifásica, sendo a primeira 2 HAI, e a segunda 24 HAI (**Fig. 5-3**). Esse perfil de aumento de produção de  $H_2O_2$  em duas fases já havia sido sugerido anteriormente (LAMB; DIXON, 1997) como peculiar ao mecanismo de defesa de plantas. A primeira etapa está associada ao acúmulo de  $H_2O_2$  após infecção por patógenos, sendo independente do aumento de expressão de enzimas formadoras de  $H_2O_2$ . Na segunda etapa, ocorre acúmulo de EROs associada ao aumento de expressão de genes que codificam enzimas produtoras de EROs, culminando com uma resposta mais duradoura. No caso do feijão-de-corda, BR 3, essa observação é condizente com o observado no período posterior a 12 HAI.

Apesar da relevante função do  $O_2^{\cdot-}$  e do  $H_2O_2$  nas respostas de defesa de feijão-de-corda, genótipo BR 3, contra *C. gloeosporioides*, esses radicais podem reagir de forma indiscriminada e modificar moléculas como resíduos de guanina em ácidos nucleícos, promover carbanilação de proteínas, oxidar carboidratos e lipídeos de membrana alterando importantes funções celulares (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). A indução da produção de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  nas folhas primárias de feijão-de-corda por *C. gloeosporioides* não alterou o teor de proteínas totais das folhas primárias nas primeiras 24 HAI, mas reduziu seu conteúdo 48 HAI (**Fig. 6A**). De fato, a cinética bifásica de produção de  $H_2O_2$  induzida pelo *C. gloeosporioides* parece ter levado à peroxidação de lipídeos (**Fig. 6B**). Após a indução do primeiro pico de  $H_2O_2$  na primeira etapa de infecção, observou-se aumento dos teores de peroxidação de lipídeos 2 e 4 HAI com redução do teor 8 e 12 HAI (**Fig. 6B**). Na segunda etapa de indução de  $H_2O_2$  12 HAI, observou-se um maior conteúdo desse radical (**Fig. 5-3**), que foi acompanhado por um aumento mais acentuado do teor de peroxidação de lipídeos 48 e 72 HAI. Esses dados apontam que a produção de  $H_2O_2$  nos dois picos durante a fase bifásica de indução de  $H_2O_2$  pelo fungo *C. gloeosporioides* é sucedido pela indução de estresse oxidativo como evidenciado pelo aumento do conteúdo de TBARS 2 e 4 HAI e

---

posteriormente, 48 e 72 HAI. Resposta semelhante foi demonstrada em *Solanum tuberosum*, onde a indução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo patógeno hemibiotrófico *Phytophthora infestans* promove aumento de peroxidação lipídica (RASTOJI; POSPÍSIL, 2012). De acordo com Eloy *et al.*, (2007), folhas agro-infiltradas com ácido salicílico e glucose + oxidase da glucose seguidas de inoculação com *C.gloeosporioides*, apresentaram aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica resultando na modificação do estilo de vida *C.gloeosporioides* que passou a ter desenvolvimento subcuticular intramural necrotrófico. Quando folhas foram agro-infiltradas com catalase e cloreto de difenil iodônio seguidas de inoculação com *C.gloeosporioides*, observou-se redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidação lipídica e *C.gloeosporioides* passou a desenvolver infecção hemibiotrófica intracelular, indicando que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das estratégias de infecção de *C.gloeosporioides*.

O processo de infecção e desenvolvimento de diversas espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* sobre várias culturas é bem descrito e similar entre as várias espécies. O processo de infecção se inicia com a adesão dos conídios de *Colletotrichum* sobre a cutícula das células hospedeira gerando, posteriormente, o tubo germinativo ou hifa germinativa em cuja extremidade se desenvolve o apressório (MÜNCH *et al.*, 2008). Em feijão-de-corda, genótipo BR 3, os conídios de *C. gloeosporioides* aderiram à superfície da cutícula das folhas primárias 4 HAI, germinaram 8 HAI, com aparente formação de apressório 12 e 24 (**Fig 7 e 8**). Esse momento de formação do apressório verificado no presente estudo está de acordo com o que foi descrito na literatura, onde se relata que, em geral, essa formação do apressório nas espécies de *Colletotrichum*, em interação com outras várias culturas vegetais, ocorre nas primeiras 24 horas após infecção. Por exemplo, 12 HAI e 18 HAI para *C. lindemuthianum* em interação com *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, respectivamente, 24 HAI para *C. lagenarium* com *Cucumis melo*, e 24 HAI para *C. gloeosporioides* com *V. unguiculata* (O'CONNELL *et al.*,

---

1985; BAILEY *et al.*, 1990; GE; GUEST, 2011; MOURA *et al.*, 2014). Interessante foi que, mesmo havendo desenvolvimento e formação da hifa de germinação e apressório, mudanças morfológicas foram observadas na superfície dos conídios a partir de 8 HAI (**Fig. 7F, G e H**), tempo após já ter havido geração aumentada diferencial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 HAI) em relação às plantas controles (**Fig. 5 – 3**). Alterações morfológicas da superfície dos conídios e apressórios bem como alterações ultraestruturais nos conídios, vesículas multilobadas foram observadas (**Fig. 8**), também, com 12, 24, 48 e 72 HAI, coincidindo com a segunda fase de aumento de geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12 HAI (**Fig. 5 – 3**). Essas observações sugerem, fortemente, que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuiu para o insucesso do *C. gloeosporioides* em colonizar o feijão-de-corda, genótipo BR 3. Apesar do papel bem contundente do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na resistência de plantas a fungos biotróficos, o efeito benéfico, ou não, desse radical ainda não é bem definido no processo de infecção de patógenos com estilo de vida hemibiotrófico. Contudo, recentes estudos vêm mostrando que esse radical desempenha papel importante nessa resistência, dependendo da duração da fase biotrófica adotada por fungos hemibiotróficos no início da infecção. Por exemplo, a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas de *Triticum aestivum* pela infiltração da planta com catalase ocasionou maior susceptibilidade ao fungo hemibiotrófico *Septoria tritici*, enquanto que o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocasionou maior resistência (SHETTY *et al.*, 2007). Dados semelhantes foram relatados com o cultivar resistente de *Theobroma cacao* ao fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, pois, nas etapas iniciais da infecção, degradação de cristais de oxalato de cálcio, um precursor da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi observado, com consequente aumento do teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 24 HAI (DIAS *et al.*, 2011). Por outro lado, esse padrão de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plantas em resposta a fungos hemibiotróficos nem sempre é observado. A infiltração de catalase em plantas de *Brassica napus* resultou em diminuição no desenvolvimento das lesões necróticas produzidas pelo fungo hemibiotrófico *Leptosphaeria maculans*, enquanto que seu aumento implicou em menor resistência (JINDRICOVÁ *et al.*,



---

2011). O papel do  $H_2O_2$  em conferir ou não resistência a patógenos com estilo de vida hemibiotrófico está associado ao comportamento do organismo em assumir uma fase biotrófica mais ou menos duradoura nas etapas iniciais de desenvolvimento. Na interação com *V. unguiculata*, o fungo *C. gloeosporioides*, desenvolve inicialmente uma fase biotrófica duradoura no início do desenvolvimento. Essa característica pode justificar a maior resistência do feijão-de-corda, genótipo TE 97 411, a penetração por *C. gloeosporioides* devido à acumulação de altos teores de  $H_2O_2$  epidérmico sobre apressórios e tubos germinativos (BARRETO *et al.*, 2007). Assim, a produção de  $H_2O_2$  nas etapas iniciais da interação é crucial para indução dos mecanismos de defesa e resistência de feijão-de-corda ao *C. gloeosporioides*.

Apesar do  $H_2O_2$  bem como o ânion  $O_2^{\cdot-}$ , aparentemente, serem moléculas importantes no mecanismo de defesa do feijão-de-corda, genótipo BR 3, contra *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), esses radicais são danosos não apenas ao fungo, mas a moléculas que compõem o sistema vegetal. Apesar da presença do *C. gloeosporioides* ter induzido estresse oxidativo nas folhas primárias de feijão-de-corda, genótipo BR 3, nenhum sintoma necrótico indicativo de morte celular foi observado. Nesse sentido, plantas de feijão-de-corda devem dispor de um sistema antioxidante eficaz capaz de controlar o excesso de EROs geradas no ambiente celular após o estresse biótico. Sabe-se que o aumento do teor das EROs gera desbalanço metabólico, levando à ativação de cascatas de transdução de sinais que ativam mecanismos de defesa antioxidante, na tentativa da planta manter a homeostase redox celular (DAVLETOVA *et al.*, 2005). Para minimizar o dano oxidativo induzido pelo fungo *C. gloeosporioides*, plantas de feijão-de-corda, genótipo BR 3, dispõem de mecanismos enzimáticos, envolvendo as enzimas *SOD*, *CAT*, *APX* e *PRX*, capazes de detoxificar EROs. Nesse trabalho, o perfil de expressão dos transcritos de diferentes genes apresentou padrão de

---

expressão sítio específico. A análise dos transcritos dos três genes de *SOD* associado à expressão de enzimas decompositoras de  $O_2^{\cdot-}$ , e concomitante geração de  $H_2O_2$ , que codificam isoformas endereçadas a compartimentos celulares específicos (*VuFeSODI* e *VuCuZnSODII* – cloroplasto e *VuCuZnSODI* - citosol) mostraram, de forma bem evidente, repressão da síntese dos transcritos correspondentes, 2 HAI, (**Fig. 12**) em resposta à infecção, indicando que o aumento de  $H_2O_2$  nos momentos iniciais da interação (**Fig. 5**) provem de outro(s) compartimento(s) celular(es) e de outra(s) via(s) como aminas oxidases, oxalato oxidases ou dismutases de superóxidos presentes no espaço apoplástico. É provável que esse  $H_2O_2$  produzido na fase inicial da interação possa estar envolvido no mecanismo de restrição da penetração inicial do *C. gloeosporioides* no feijão-de-corda, bem como funcionar como uma molécula sinalizadora de respostas de defesa e indução da expressão de genes que codificam proteínas importantes para a planta (QUAN *et al.*, 2008).

Durante a segunda etapa da cinética de produção do  $H_2O_2$ , a partir de 8 HAI (**Fig. 12B e C**), a síntese aumentada dos transcritos dos genes *VuCuZnSODI* e *VuCuZnSODII* parece estar ligada à geração desse radical, no citoplasma e cloroplastos, respectivamente. Além disso, o gene *VuFeSODI*, que codifica uma isoforma endereçada ao cloroplasto, apresentou alta expressão, com base na análise de seu transcrito, 72 HAI, semelhante ao que havia sido observado, anteriormente, por nosso grupo de pesquisa, para a proteína codificada, por meio de abordagem proteômica (MOURA *et al.*, 2014).

Com relação à expressão dos genes associados a enzimas removedoras de  $H_2O_2$ , três famílias gênicas, *APX*, *CAT* e *PRX* foram analisadas. O gene *VuAPXI* apresentou aumento de expressão 12 HAI, indicando ser induzido pelos eventos iniciais. *VuAPXI* está associado à síntese de uma *APX* citosólica que pode estar envolvida na regulação dos teores de  $H_2O_2$  formado na segunda etapa de produção desse radical (**Fig. 13A**). Resultados semelhantes foram obtidos por meio de estudos proteômicos onde, uma peroxidases do ascorbato mostrou-

---

se diferencialmente expressa em plantas de feijão-de-corda quando desafiadas com *C. gloeosporioides* (MOURA *et al.*, 2014). Como demonstrado por Agrawal *et al.*, (2003), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno bem como o fungo hemibiotrófico *Magnaporthe grisea* foram capazes de induzir a síntese dos transcritos dos genes de peroxidases do ascorbato, *OsAPX1* e *OsAPX2*, em *Oryza sativa*. Já em *Nicotiana tabacco*, a superexpressão do gene de peroxidases do ascorbato de *Capsicum annuum* (*CAPOA1*) conferiu resistência ao estresse oxidativo e resistência ao fungo oomiceto *Phytophthora nicotianae* (SAROWAR *et al.*, 2005). Já o vírus do mosaico do tabaco (TMV) induz morte celular programada (PCD) em células de *Nicotiana tabacco*, pois suprime a tradução de transcritos de APX citosólica (cAPX) (MITTLER *et al.*, 1998).

Além dos genes da *APX*, outros genes também estão envolvidos no metabolismo de remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No presente estudo, a síntese dos transcritos dos genes peroxissomais, *VuCATI* e *VuCATII*, que codificam para catalase, foram fortemente reprimidos logo após à infecção, 2 HAI, mas, algumas horas depois, 12 HAI, induzidos (**Fig. 13B e C**). Esses resultados para tais transcritos são condizentes com os dados de atividade enzimática para catalase obtidos no estudo da interação do feijão-de-corda, genótipo de BR 3, com *C. gloeosporioides* (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Além da análise do perfil transcricional dos genes da *APX* e *CATs* na manutenção do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o papel dos genes da família das peroxirredoxinas também foi analisado. O gene *Vu1Cysprx*, nuclear, não apresentou expressão significativa em relação aos demais genes de *PRXs*, indicando ser o mesmo pouco influenciado na resposta de interação de feijão-de-corda com *C.gloeosporioides*. De fato, até o presente, não há relatos do envolvimento da enzima 1CysPrx em repostas de defesa de plantas. A expressão de genes *1CysPrx* está bem relacionada a eventos envolvendo dormência e embriogênese (AaLEN *et al.*, 1994; STACY *et al.*, 1996).

Em cloroplastos, APXs e PRXs representam as principais enzimas envolvidas na manutenção do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MILLER *et al.*, 2010), tendo os genes que codificam várias PRXs papéis fisiológicos importantes. Por exemplo, os genes *2CysPrx* estão envolvidos em eventos associados à proteção do aparato fotossintético, resposta à seca e à baixa temperatura (KÖNIG *et al.*, 2002; KÖNIG *et al.*, 2003). Transcritos de *2CysPrx* também são responsivos ao tratamento com peróxido de hidrogênio (HORLING *et al.*, 2003). Com relação aos genes *2CysPrx*, que codificam as proteínas Vu2CysprxA e Vu2CysprxB, apresentaram, 12 HAI, pouca alteração na síntese dos transcritos correspondentes, indicando inibição da transcrição (**Fig. 14 B e C**). Essa inibição pode estar relacionada ao aumento do teor de peróxido observado durante a segunda etapa da cinética bifásica de expressão desse radical (**Fig. 5 - 3**). *PrxQ* consiste em outro gene dentro da família multigênica das peroxirredoxinas atípicas de plantas, que codifica uma isoforma que apresenta um peptídeo que a endereça ao cloroplasto (ROUHIER *et al.*, 2004). Estudos já relataram o aumento de expressão de transcritos de *PrxQ* em resposta à infecção por patógenos. No presente estudo, da interação do feijão-de-corda, genótipo BR 3, com o *C. gloeosporioides*, aparentemente houve repressão dos transcritos para VuPrxQ (**Fig. 14C**). Resultados diferentes a esse acima foram obtidos na interação incompatível entre plantas resistentes de *Populus Trichocarpa* e o fungo *Melampsora laricii-populina*, onde os transcritos de *PrxQ* de *Populus Trichocarpa* apresentaram aumentados em resposta à infecção. Contudo, na interação compatível com plantas susceptíveis, esses transcritos apresentaram redução da expressão dos transcritos (ROUHIER *et al.*, 2004).

De acordo com os dados obtidos, as respostas induzidas em feijão-de-corda, genótipo BR 3, pelo *C. gloeosporioides* levaram à redução da síntese de transcritos de VuPrxQ, 12 HAI, sugerindo sua não participação na síntese da respectiva isoforma envolvida na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cloroplastos. Com base na análise dos transcritos, dentre todos os

---

genes avaliados, *VuPrxIIBCD* citosólico apresentou maior expressão relativa, sendo expresso quase 10 vezes mais, logo após à infecção, 2 HAI, quando comparado ao tempo inicial (0 HAI). Posteriormente, outro pico de expressão para esse gene foi observado, 72 HAI (**Fig. 14E**).

Os genes referentes aos membros da família das peroxirredoxinas tipo II A, B, C e D, atípicas em *A.thaliana*, codificam enzimas endereçadas ao citosol, onde, em conjunto com APXs regulam os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MILLER *et al.*, 2010). Em plantas, as PrxIIs participam do sistema de defesa antioxidante contra estresse induzido por déficit hídrico (PrxIIB), por estresse induzido por intensidade luminosa ou deficiência de fósforo (PrxIIC) e estresse induzido por deficiência nutricional (PrxIID) (GAMA *et al.*, 2008; HORLING *et al.*, 2003; KANDLBINDER *et al.*, 2004; FINKEMEIER *et al.*, 2005). Contudo, não há nenhum relato do envolvimento de PrxII citosólicas na proteção contra estresse oxidativo induzido por estresses bióticos. Assim, dentre os genes antioxidantes, *VuPrxIIBCD* parece ter papel fundamental na regulação dos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no citosol. Com relação à regulação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no cloroplasto, o gene *VuPrxIIE*, que codifica uma isoforma plastidial, aparenta ter função relevante algumas horas (12 HAI) após à infecção. Nas etapas iniciais da infecção, o gene *VuPrxIIE* se apresentou subexpresso, com posterior aumento dos transcritos correspondentes, 24 e 48 HAI (**Fig. 14F**). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos proteômicos conduzidos por nosso grupo de pesquisa (MOURA *et al.*, 2014), que mostrou conteúdo aumentado da proteína PrxIIE, 24 e 48 HAI, nas plantas de feijão-de-corda, genótipo BR 3, infectadas com o *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) em comparação com plantas controles, não infectadas.

A cinética dos transcritos do gene *VuPrxIIFI*, que codifica uma isoforma mitocondrial de PRX, apresentou diferenças nos tempos de 8, 24 e 48 HAI (**Fig. 14G**). Enquanto que outro gene mitocondrial, *VuPrxIIFII*, não apresentou qualquer alteração

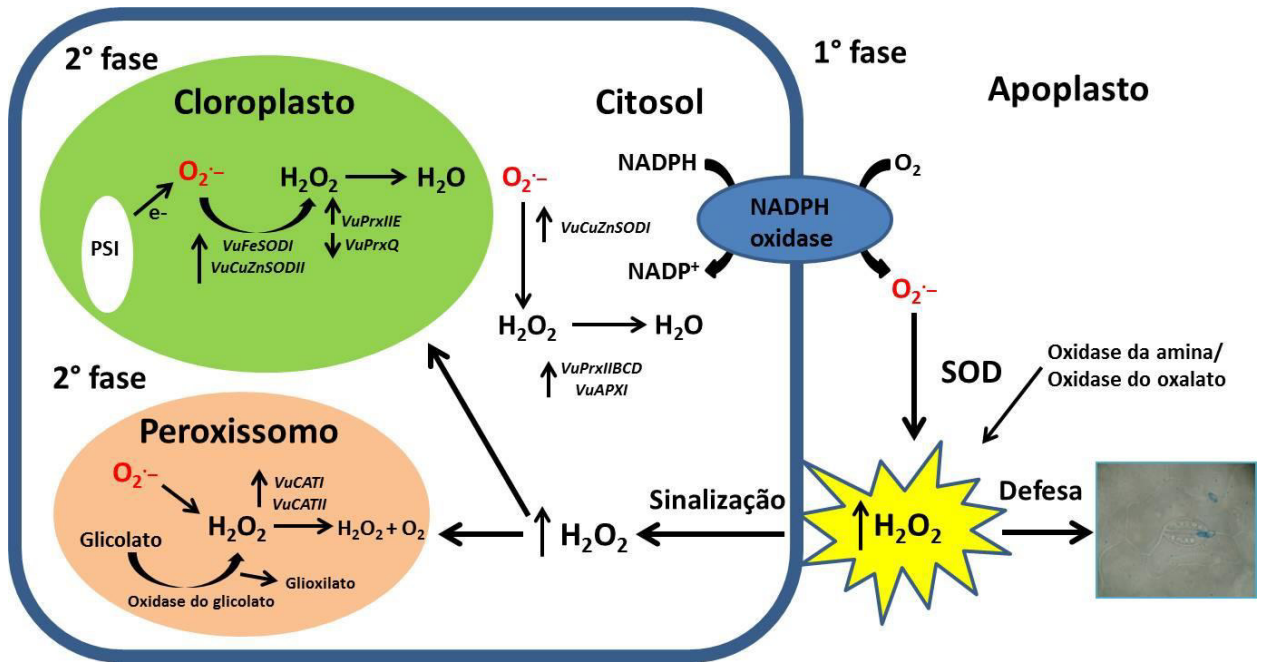
---

significativa de expressão, pela avaliação de seu transcrito correspondente, por todo o período experimental, 72 HAI (**Fig. 14H**).

Com relação ao papel das peroxirredoxinas IIF (PrxIIF), estas possuem papel relevante na proteção contra a demanda oxidativa associada a estresses abióticos (DIETZ, 2011). Aumento transcricional foi verificado em resposta ao tratamento de plantas com cádmio, ao frio e a metais pesados (FINKEMEIER *et al.*, 2005 e BARRANCO-MEDINA *et al.*, 2007). Entretanto, nenhum trabalho já relatou o papel das PrxIIF com estresses bióticos. Os dados obtidos aqui nesse presente trabalho sugerem o pouco envolvimento dos genes *VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII* na interação entre o feijão-de-corda BR 3 e o *C. gloeosporioides*.

Baseado nos resultados apresentados e discutidos acima, um modelo de indução de resposta de defesa em feijão-de-corda, genótipo BR 3, ao fungo hemibiotrófico *C. gloeosporioides* foi proposto (**Fig. 15**), bem como, uma provável função do  $H_2O_2$  e genes da planta associados à defesa antioxidante. Plantas de *V. unguiculata* produzem  $H_2O_2$  em uma primeira etapa, como consequência da tentativa de infecção por parte do *C. gloeosporioides*. O  $H_2O_2$  produzido nessa primeira etapa pode atuar de duas formas: (i) atuar como molécula tóxica, gerando efeitos deletérios sobre o fungo *C. gloeosporioides*, restringindo seu crescimento; ou (ii) funcionar como molécula sinalizadora em eventos de transdução de sinal ativando cascatas de resposta de defesa. A indução de respostas de defesa aciona uma segunda fase de produção de  $H_2O_2$ , evidenciado 12 HAI, e associado com aumento de expressão dos genes *VuCuZnSODI* e *VuCuZnSODII*, cujas enzimas codificadas dismutam o  $O_2^{\cdot-}$  gerando  $H_2O_2$  que, por sua vez, age como agente antifúngico e molécula sinalizadora da ativação de genes de defesa (**Fig. 7 e 8**). Em paralelo, o excesso transiente de  $H_2O_2$  gerado exerce efeito sobre o status redox de *V. unguiculata* (**Fig. 6B**) induzindo, como consequência, aumento de expressão dos genes *VuAPXI*, *VuCATI*, *VuCATII*, *VuPrxIIBCD* e *VuPrxIIE*, envolvidos no metabolismo de remoção do  $H_2O_2$ , e que regulam seus níveis em compartimentos celulares

específicos, na tentativa de manutenção da homeostase redox. De acordo com os resultados desse presente estudo, esses mecanismos envolvidos na resposta de defesa envolvendo a cinética de geração e remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram efetivos, pois, impediram o desenvolvimento do *C. gloeosporioides*, ao mesmo tempo em que foram eficientes em controlar o estresse oxidativo iminente, por meio do sistema de defesa antioxidante, ou seja, de enzimas antioxidantes, evitando, assim, indução da morte celular programada (PCD), mantendo a homeostase redox celular, e evitando a necrose característica da antracnose, doença associada ao parasitismo por fungos do gênero *Colletotrichum*.



**Figura 15.** Mecanismo hipotético das respostas de defesa do feijão-de-corda, genótipo BR 3, contra o fungo hemibiotrófico *C. gloeosporioides*. Durante a cinética de infecção, ocorre produção de  $H_2O_2$  no apoplasto na 1ª fase logo após à infecção, que pode atuar diretamente sobre o patógeno ou, no citosol, participar na transdução de sinais e induzir repostas de defesa, ativando a expressão de genes associado a superóxido dismutases (*VuFeSODI*, *VuCuZnSODI* e *VuCuZnSODII*) no citosol e cloroplasto. O aumento do conteúdo de  $H_2O_2$  produzido na 2ª fase deve induzir a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante (*VuCATI* e *VuCATII* – peroxissomos; *VuAPXI* e *VuPrxIIBCD* – citosol; *VuPrxQ* e *VuPrxIIE* – cloroplastos) que possivelmente, regulam os níveis de  $H_2O_2$ , mantendo a homeostase redox celular.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o genoma de *V. unguiculata* apresenta pelo menos oito genes funcionais (*Vu1Cysprx*, *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxQ*, *VuPrxIIBCD*, *VuPrxIIE*, *VuPrxIIFI*, *VuPrxIIFII*) que codificam peroxirredoxinas (PRXs) endereçadas para diversos compartimentos celulares, onde desempenham funções sítio-específicas com diferentes padrões de expressão. Com relação ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda, genótipo BR 3, durante processo de infecção com *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), os dados apontam que o fungo induz respostas de defesa de *V. unguiculata* caracterizado através da explosão oxidativa, evidenciado pela detecção indireta de  $O_2^{\cdot-}$  e, em especial, pelo  $H_2O_2$ . De acordo com os dados obtidos aqui, o  $H_2O_2$  gerado inicialmente, possivelmente funcionou como agente antifúngico e como molécula sinalizadora induzindo respostas de defesa. A geração de  $H_2O_2$ , nas primeiras horas após a infecção, parece ter sido independente da participação dos sistemas antioxidantes enzimáticos estudados, sugerindo que outros sistemas atuam na produção inicial de  $H_2O_2$ . Numa segunda fase, após algumas horas do início da infecção da planta pelo *C. gloeosporioides*, também houve aumento de expressão de genes codificantes de SOD, envolvidos na defesa antioxidante produção de  $H_2O_2$ , bem como aumento de APX, CAT e PRX, enzimas decompositoras de  $H_2O_2$ . A ausência de sintomas visíveis indicou que o mecanismo de defesa antioxidante parece ter sido eficiente em regular os radicais gerados, ao ponto de restringir o desenvolvimento do fungo durante a fase biotrófica de desenvolvimento e, ao mesmo tempo, amenizar o estresse oxidativo gerado devido ao aumento das EROs. Foi mostrado por microscopia haver uma boa disseminação do fungo evidenciado pela formação da massa hifal sobre a superfície das folhas. Contudo, apesar do desenvolvimento e da tentativa de infecção, alterações ultraestruturais foram evidenciadas na superfície dos conídios particularmente, após o primeiro pico de  $H_2O_2$ , o que pode está associado ao insucesso no processo de colonização da

---

planta pelo *C. gloeosporioides*, que desenvolve uma fase biotrófica nas etapas iniciais da interação.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALEN, R. B.; OPSAHL-FERSTAD, H. G.; LINNESTAD, C.; OLSEN, O. A. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. **Plant Journal**, v. 5, p. 385–396, 1994.

ADEGBITE, A. A.; AMUSA, N. A. The major economic field diseases of cowpea in the humid agro-ecologies of South-western Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4706-4712, 2008.

AGRAWAL, G. K., JWA, N. S., IWAHASHI, H., RAKWAL, R. Importance of ascorbate peroxidases *OsAPX1* and *OsAPX2* in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. **Gene**, v. 322, p. 93–103, 2003.

AKINWUNMI, O.; LATUNDE-DADA. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transiente, confinement and breakout. **Molecular Plant Pathology**, v. 2, p. 187-198, 2001.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-402, 1997.

APEL, K. E.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.

ARAN, M.; CAPORALETTI, D.; SENN, A. M.; TELLEZ DE IÑON, M. T.; GIROTTI, M. R.; ILERA, A. S.; WOLOSUK, R. A. ATP-dependent modulation and autophosphorylation os rapeseed 2-Cys peroxiredoxin. **FEBS Journal**, v. 275, p. 1450-1463, 2008.

ASADA, K. The water-water cycle in choloplast: Scavenging of Active oxygen's and dissipation excess photons. **Annual Review of Plant Biology**, v. 50, p. 601–639. 1999

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. DOS. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. J. (Org.) **A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina, Embrapa Meio-Norte. p. 264, 2000.

BAIER, M.; NOCTOR, G.; FOYER, C. H.; DIETZ, K. J. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in Arabidopsis specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. **Plant Physiology**, v. 124, p. 823–832, 2000.

BAIER, M.; DIETZ, K. J. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxides reductase. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 553-564, 1996.

---

BAILEY, J. A.; NASH, C.; O'CONNELL R. J. Infection process and host specificity of a *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of cowpea, *Vigna unguiculata*. **Mycological Research**, v. 94, p. 810 – 814, 1990.

BALOWS A, HAUSLER W. J, HERRMAN K. L. Manual of Clinical Microbiology, 5<sup>th</sup> Ed, **American Society of Microbiologists**, Washington, 1991.

BARRANCO-MEDINA, S.; KRELL, T.; FINKEMEIER, I.; SEVILLA, F.; LÁZARO, J. J.; DIETZ, K. J. Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, pp. 729-739, 2007.

BARRETO, A. L. H.; VASCONCELOS, I. M.; GRANGEIRO, T. B.; MELO, V. M. M.; MATOS, T. E.; ELOY, Y. R. G.; FERNANDES, C. F.; TORRES, D. C.; FREIRE-FILHO, F. R.; FREIRE, F. C. O.; OLIVEIRA, J. T. A. Infection process and host defense responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. **International Journal of Plant Science**, v. 168, p. 193–203, 2007.

BERNROITNER, M.; ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P. G.; PESCHEK, G. A.; OBINGER, C. Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 423–440, 2009.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 850-859. 2011.

BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 379–406, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CARR, J. P.; LEWSEY M. G.; PALUKAITIS, P. Signaling in Induced Resistance. **Advances in Virus Research**, v. 76, p. 57-121, 2010.

CARROLL, M. J.; SCHMELZ, E. A.; TEAL, P. E. A. The attraction of *Spodoptera frugiperda* neonates to cowpea seedlings is mediated by volatiles induced by conspecific herbivory and the elicitor inceptin. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 291-300, 2008.

CHAE, H. Z.; KIM, I. H.; KIM, K. Cloning, sequencing and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 16815-16821, 1993.

CLARKE, D. J.; ORTEGA. X. P.; MACKAY. C. L.; VALVANO. M. A.; GOVAN, J. R. W.; CAMPOPIANO, D. J.; LANGRIDGE-SMITH, P.; E BROWN, A. R. Subdivision of the bacterioferritin comigratory protein family of bacterial peroxiredoxins based on catalytic activity. **Biochemistry**, v. 49, p. 1319–1330, 2010.

---

CROUCH, J.; O'CONNELL, R.; GAN, P.; BUIATE, E.; TORRES, M. F.; BEIRN, L.; SHIRASU, K.; VAILLANCOURT, L. The genomics of *Colletotrichum*. In: **Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocots Pathogens.**, Berlin: Springer, 2014. cap. 3, p. 69-101.

DAS, S.; DeMASON, D. A.; EHLERS, J. D.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1305-1313, 2008.

DAVIDSON, J. F. E.; SCHIESTL, R. H. Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 8483-8489, 2001.

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D. J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; AND MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis.sp.* **The Plant Cell**, v. 17, p. 268-281, 2005.

DE YOUNG, B. J.; INNES, R. S. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, v. 12, p. 1243-1252, 2006.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO L. M.; CORPAS F. J.; PALMA J. M.; BARROSO J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DIAS, C. V.; MENDES J. S.; SANTOS, A. C.; PIROVANI C. P.; GESTEIRA, A. S.; MICHELE, F.; GRAMACHO, K. P.; HAMMERSTONE, J.; MAZZAFERA, P.; CASCARDO, J. C. M. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 917-922, 2011.

DIETZ, K. J. Plant peroxiredoxins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 93-107, 2003.

DIETZ, K. J. Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 1129-1159, 2011.

DIETZ, K. J.; HORLING, F.; KÖNIG, J.; BAIER, M. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1321-1329, 2002.

DIETZ, K. J.; JACOB, S.; OELZE, M. L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V. DE MIRANDA.; S. M. N.; BAIER, M.; FINKEMEIER, I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism, **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1697-1709, 2006.

DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J.; CATANZARITI A, M.; TEH, T.; CHING-I, A. W.; AYLIFFY, M. A.; KOBE, B., ELLIS, J. G. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p. 8888-8893, 2006.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopatology**, v. 20, p. 155-171, 1996.

ELOY, Y. R. G. (2007). Papel do peróxido de hidrogênio na interação do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. [TELEOMORFO. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & von Schrenk]. Dissertação de mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Ceará.

ENGLER, J. A.; FAVERY, B.; ENGLER, G.; ABAD, P. Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 112-117, 2005.

FAIZE, M.; BURGOS, L.; FAIZE, L.; PETRI, C.; BARBA-ESPIN, G.; DÍAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; ALBURQUERQUE, N.; HERNANDEZ, J. A. Modulation of tobacco bacterial disease resistance using cytosolic ascorbate peroxidase and CuZn-superoxide dismutase. **Plant Pathology**, v. 61, p. 858–866, 2012.

FERRO, D.; ARAN, M.; RIMMAUDO, L.; WOLOSUK, R. A. The C-terminal extension of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin is critical for interaction with ATP. **Biochemistry**, v. 51, pp. 2169-2171, 2012.

FINKEMEIER, I.; GOODMAN, M.; LAMKEMEYER, P.; KANDBINDER, A.; SWEETLOVE, L. J.; DIETZ, K. J. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 12168-12180, 2005.

FLOHÉ, L.; BUDDE, H.; BRUNS, K.; CASTRO, H.; CLOS, J.; HOFMANN, B.; KANSAL-KALAVAR, S.; KRUMME, D.; MENGE, U.; PLANK-SCHUMACHER, K.; SZTAJER, H.; WISSING, J.; WYLEGALLA, C.; HECHT, H. J. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, p. 324-335, 2002.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.

FOYER, C.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. *In*: Araújo, J. P. P. de.; Watt, E. E. **O Caupi no Brasil**. Goiânia: Embrapa-CNPAP/Ibadan: ITTA. 1988. p. 26-46.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, V. R. **Feijão-caupi no Brasil – Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina, EMBRAPA Meio-Norte, p. 84, 2011.

GAMA, F.; BREHELIN, C.; GELHAYE, E.; MEYER, Y.; JACQUOT, J. P.; REY, P.; ROUHIER, N. Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx III. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 599–610, 2008.

GAY, C.; COLLINA, J.; GEBICKI, J. M. Hydrogen peroxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149-155, 1999.

---

GE, Y.; GUEST, D. I. Light and scanning electron microscopy studies on the infection process of melon leaves by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 76, p. 67-74, 2011.

GENOT, G.; WINTZ, H.; HOUNLÉ, G.; JAMET, E. Molecular characterization of a bean chloroplastic 2-cys-peroxiredoxin. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 449-459, 2001.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY S, K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p 51-65, 2012.

HALL, A. E.; CISSE, N.; THIAW, S.; ELAWAD, H. O. A.; EHLERS, J. D.; ISMAIL, A. M.; FERY, R. L.; ROBERTS, P. A.; KITCH, L. W.; MURDOCK, L. L.; BOUKAR, O.; PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H. Development of cowpea cultivars and germplasm by the Bean/Cowpea CRSP. **Field Crop Research**, v. 82, p. 103–134, 2003.

HALL, A.; KARPLUS, P. A., POOLE, L. B. Typical 2-Cys peroxiredoxins: structures, mechanisms and functions. **FEBS Journal**, v. 276, p. 2469–2477, 2009.

HASLEKAS, C.; VIKEN, M. K.; GRINI, P. E.; NYGAARD, V.; NORDGARD, S. H.; MEZA T. J.; AALEN, R. B. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. **Plant Physiology**, v.133, p. 1148–57, 2003.

HELLEMANS, J.; MORTIER. G.; PAEPE, A. DE.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, R19, 2007.

HELLER, J.; TUDZYNSK, P. Reactive Oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development and disease. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 369–90, 2011.

HOAGLAND, D. R., E ARNON, D. I. (1950). The Water Culture method for growing plants with-out soil, vol. 347, California Agric. **Experimental Station of University of California**, Berkeley, p. 139, 1959.

HOFMANN, B.; HECHT, H. J.; E FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 383, p. 347-364, 2002.

HORBACH, R.; NAVARRO-QUESADAC, A. N.; KNOGGEC, W.; DEISINGA, H. B. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**, v. 168. p. 51–62, 2011.

HORLING, F.; KÖNIG, J.; DIETZ, K. J. Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 491–499, 2002.

HORLING, F.; LAMKEMEYER, P.; KONIG, J.; FINKEMEIER, I.; KANDBINDER, A.; BAIER, M.; DIETZ, K. J. Divergent light, ascorbate and oxidative stress-dependent

regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 131, p. 317–325, 2003.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

HYDE, K. D.; CAI, L. CANNON, P. F.; CROUCH, J. A.; CROUS, P. W.; DAMM, U.; GOODWIN, P. H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P. R.; JONES, E. B. G.; LIU, Z. Y.; JANNAT, R.; URAJI, M.; HOSSAIN, M. A.; ISLAM, M. M.; NAKAMURA, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Catalases negatively regulate methyl jasmonate signaling in guard cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1012– 1016, 2012.

JANG, H. H.; LEE, K. O.; CHI, Y. H.; JUNG, B. G.; PARK, S. K.; PARK, J. H.; LEE, J. R.; LEE, S. S.; MOON, J. C.; YUN, J. W.; CHOI, Y. O.; KIM, W. Y.; KANG, J. S.; CHEONG, G. W.; YUN, D. J.; RHEE, S. G.; CHO, M. J.; LEE, S. Y. Two Enzymes in One: Two Yeast Peroxiredoxins Display Oxidative Stress-Dependent Switching from a Peroxidase to a Molecular Chaperone Function. **Cell.**, v. 117, p. 625–635, 2004.

JINDRICOVÁ, B.; FODOR, J.; SINDELÁROVÁ, M.; BURKETOVÁ L.; E VALENTOVÁ, O. Role of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the interaction between a hemibiotrophic fungal pathogen, *Leptosphaeria maculans* and oilseed rape. **Environmental and Experimental Botany**, v.72, p. 149–156, 2011.

JONES, J. D. G.; DANGL J. L. The plant immune system. **Nature Reviews**, v. 444, p. 323-329, 2006.

JÜRGEN FEIERABEND. Ascorbate Peroxidase *In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. 1. ed. Oxford, Reino Unido. Blackwell Publishing, cap. 5, p. 87-100, 2005.

JÜRGEN FEIERABEND. Catalases in plants: Molecular ns Funtional Properties and Role in Stress Defense. *In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. 1. ed. Oxford, Reino Unido. Blackwell Publishing, cap. 5, p. 101-140, 2005

KANDBINDER, A.; FINKEMEIER, I.; WORMUTH, D.; HANITZSCH, M.; DIETZ, K. J. The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 63–73, 2004.

KIBA, A.; NISHIHARA, M.; TSUKATANI, N.; NAKATSUKA, T.; KATO, Y.; YAMAMURA, S. A Peroxiredoxin Q Homolog from Gentians is Involved in Both Resistance Against Fungal Disease and Oxidative Stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, p. 1006-1015, 2005.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMI A. FILHO.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1997. v. 2, p. 725.

KIM, S. Y.; JANG, H. H.; LEE, J. R.; SUNG, N. R.; LEE, H. B.; LEE, D. H.; PARK, D. J.; KANG, C. H.; CHUNG, W. S.; LIM, C. H.; YUN, D. J.; KIM, W. Y.; LEE, K. O.; LEE, S. Y.



---

Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress. **Plant Science**, v. 177, p. 227-232, 2009.

KIRÁLY, L.; BARNE, B.; KIRALY, Z. Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. **Journal of Phytopathol.**, v. 155, p. 385- 396, 2007.

KÖNIG, J.; BAIER, M.; HORLING, F.; KAHMANN, U.; HARRIS, G.; SCHURMANN, P.; DIETZ, K. J. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox hierarchy of photosynthetic electron flux. **Proceedings of National Academic Science**, v. 99, p. 5738–43, 2002.

KÖNIG, J.; LOTTE, K.; PLESSOW, R.; BROCKHINKE, A.; BAIER, M.; DIETZ, K. J. Reaction mechanism of plant 2-cys-peroxiredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 24409-24420, 2003.

KUMAR, D., YUSUF, M. A., SINGH, P., SARDAR, M. e SARIN, N. Histochemical detection of superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in *Brassica juncea* seedlings. **Bio-protocol**, v. 8, p. 1108, 2014.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

LATUNDE-DADA, A. O.; O'CONNEL, R. J.; NASH, C.; LUCAS, J. A. Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. **Plant Pathology**, v. 48, p. 777 – 784, 1999.

LATUNDE-DADA, A. O.; O'CONNEL, R. J.; NASH, C.; PRING, R.; LUCAS, J. A. BAILEY, J. A. Infection process and identity of the hemibiotrophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum*) from cowpea (*Vigna unguiculata*). **Mycological Research** v. 100, p. 1133–1141, 1996.

LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S. E.; METRAUX, J. P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LORD, C. E.; GUNAWARDENA, A. H. Programmed cell death in *C. elegans*, mammals and plants. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 603-613, 2012.

LUNA, E.; BRUCE, T. J. A.; ROBERTS, M. R.; FLORS, V.; TON J. Next generation systemic acquired resistance. **Plant Physiology**., v. 158, p. 844–853, 2012.

MARSHALL, O. Perl primer, v 1. 1. 20.1. 2003-2011.

MCKENZIE, E. H. C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S. R.; PFENNING, L. H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R. G.; TAN, Y. P.; TAYLOR, P.

---

W. J.; WEIR, B. S.; YANG, Y. L.; AND ZHANG, J. Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, p. 147–182, 2009.

MERT-TÜRK, F. Phytoalexins: Defence or just a response to stress? **Journal of Cell & Molecular Biology**, v. 1, pp. 1-6, 2002.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 352-356, 2002.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; BREUSEGEM, F, V.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 4197-4220, 2010.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. **FEBS Letters**, v. 586, p. 585–595, 2012.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, p. 453–467, 2010.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490–498, 2004.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 301-309, 2011.

MITTLER, R.; FENG, X.; COHEN, M. Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. **The Plant Cell**, v. 10, p. 461-473, 1998.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review in Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

MONTEIRO, G.; HORTA, B. B.; PIMENTA, D. C.; AUGUSTO, O.; NETTO, L. S. E. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proceedings National Academy of Sciences**, v. 104, p. 4886-4891, 2008.

MOURA, H. F. N.; VASCONCELOS, I. M.; SOUZA, C. E. A.; SILVA, F. D. A.; MORENO, F. B. M. B.; LOBO, M. D. P.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MOURA, A. A.; COSTA, J. H.; OLIVEIRA, J. T. A. Proteomic changes during the incompatible interaction between cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. **Plant Science**, v. 217, p. 158-175, 2014.

MÜNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSSA, D. S.; LUDWIGA, N.; SAUERB, N.; DEISINGA, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 41-51, 2008.

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 501–520, 2008.

MUTHURAMALINGAM, M.; SEIDEL, T.; LAXA, M.; NUNES DE MIRANDA, S. M.; GÄRTNER, F.; STRÖHER, E.; KANDBINDER, A.; DIETZ, K. J. Multiple redox and non-redox interactions define 2-Cys peroxiredoxin as a regulatory hub in the chloroplast. **Molecular Plant**, v. 2, p. 1273-1288, 2009.

NOGUERA, M. V.; KRIMM, I.; WALKER, O.; LANCELIN, J. M. Protein-protein interactions within peroxiredoxin systems. **Photosynthesis Research.**, v. 89, p. 277–290, 2006.

NÜRNBERGER, T.; KEMMERLING, B. PAMP-triggered basal immunity in plants. **Advances in Botanical Research**, v. 51, p. 2-38, 2009.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, p. 75-98, 1985.

O'CONNELL, R. J.; THON, M. R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S. G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M. F.; DAMM, U.; BUIATE, E. A.; EPSTEIN, L.; ALKAN, N. *et al.*, Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1060–1065, 2012.

O'CONNELL, R. J.; HERBERT, C.; SREENIVASAPRASAD, S.; KHATIB, M.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. A novel Arabidopsis-Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p. 272-282, 2004.

OLIVEIRA, J. T. A.; BARRETO, A. L. H.; VASCONCELOS, I. M.; ELOY, Y.R.G.; GONDIM, D. M. F.; FERNANDES, C. F.; FREIRE-FILHO, F. R. Role of antioxidant enzymes, hydrogen peroxide and PR-Proteins in the compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) Genotypes with the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Plant Physiology and Pathology**, v. 2, p. 2-8, 2014.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *In: Advances in Cowpea Research*. 1. ed. Ibadan: Copublication: (IITA) e (JIRCAS), cap. 1. p. 1-12, 1997.

PEEVER, T. L.; HIGGINS, V. Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum*. **Plant Physiology**, v. 90, p. 867-875, 1989.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva: Proposta para atualização da legislação brasileira. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, pp. 363-470, 1998.

---

PELTIER, J. B.; CAI, Y.; SUN, Q.; ZABROUSKOV, V.; GIACOMELLI, L.; RUDELLA, A.; YTTTERBERG, A. J.; RUTSCHOW, H.; VAN WIJK, K. J. The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, p. 114–133, 2006.

PEREZ, I. B.; BROWN, P. J. The role of ROS signalling in cross-tolerance: from model to crop. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1-6, 2014.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and funga-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.

PRADO, E. M.; GRELLET, C. F.; SALAZAR, S. M.; CASTAGNARO, A. P.; DÍAZ RICCI, J. C.; ARIAS, M. E. Histopathology of the resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* of wild strawberries and species related to commercial strawberry. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, p. 1147-1153, 2012.

PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. Dissecting the Cell Biology of *Colletotrichum* Infection Process. In: **Colletotrichum: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. 1. ed. Minnesota: APS Press, cap. 5, p. 57-77, 2000.

QI, Y.; TSUDA, K.; GLAZEBROOK, J.; KATAGIRI, F. Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in *Arabidopsis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 702–708, 2011.

QUAN, LI-RUAN., ZHANG, BO., SHI, WEI-WEI, LI, HONG-YU. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 2-18, 2008.

RASTOGI, A.; POSPÍŠIL, P. Production of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in potato tuber during the necrotrophic phase of hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* infection. **Journal of Phytochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 202-206, 2012.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signaling**, v. 24, p. 981–990, 2012.

REAPE, T. J.; MOLONY, E. M.; MCCABE, P. F. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 435–444, 2008.

RHEE, S. G.; KANG, S. W.; CHANG, T. S.; JEONG, W.; KIM, K. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. **International of Union Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 52, p. 35–41, 2001.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; GUALBERTO, J. M.; JORDY, M. N.; DE FAY, E.; HIRASAWA, M.; DUPLESSIS, S.; LEMAIRE, S. D.; FREY, P.; MARTIN, F.; MANIERI, W.; KNAFF, D. B.; JACQUOT, J. P. Poplar Peroxiredoxin Q. A Thioredoxin-Linked Chloroplast Antioxidant Functional in Pathogen Defense. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1027–1038, 2004.

---

SAGI, M.; FLUHR, R. Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1281-90, 2001.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-25, 1987.

SAROWAR, S.; KIM, E. N.; KIM, Y. J.; OK, S. H.; KIM, K. D.; HWANG, B. K.; SHIN, J. S. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. **Plant Science**, v. 169, pp. 55–63, 2005.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 117-125, 2011.

SHETTY, N. P.; MEHRABI, R.; LÜTKEN, H.; HALDRUP, A.; KEMA, G. H.; COLLINGE, D. B.; JØRGENSEN, H. J. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. **New Phytologist**, v. 174, p. 637-647, 2007.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305–1319, 2002.

SILVEIRA, J. A. G., COSTA, R. C. L., OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium spp.* under moderate nitrate level. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 187–194, 2001.

SINGH, P.; KUO, Y. C.; MISHRA, S.; TSAI, C. H.; CHIEN, C. C.; CHEN, C. W.; DESCLOS-THEVENIAU, M., CHU, P. W., SCHULZE, B., CHINCHILLA, D., BOLLER, T., ZIMMERLIA, L. The lectin receptor kinase-vi.2 is required for priming and positively regulates Arabidopsis pattern-triggered immunity. **Plant Cell**, v. 24, p. 1256–1270, 2012.

STACY, R. A. P.; MUNTHE, E.; STEINUM, T.; SHARMA, B.; AALEN, R. B. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 1205-1216, 1996.

STACY, R. A.; NORDENG, T. W.; CULIANEZ-MACIA F. A.; E AALEN, R. B. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **Plant Journal**, v. 19, p. 1–8, 1999.

SUDHAKAR, C.; LAKSHMI, A.; GIRIDARAKUMAR, S. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. **Plant Science**, v. 161, p. 613- 619, 2001.

---

TAKAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6.0: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TENA, G.; BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p. 519–529, 2011.

THORDAL-CHISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEL, COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interactions. **The Plant Journal**, v. 11, p. 1187-1194, 1997.

TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1130–1134, 2006.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3 research0034, 2002.

VELLOSILLO, T.; VICENTE, J.; KULASEKARAN, S.; HAMBERG, M.; CASTRESANA, C. Emerging complexity in reactive oxygen species: Production and signaling during the response of plants to pathogens. **Plant Physiology**, v. 154, p. 444–448, 2010.

WALTERS, D. R. Polyamines and plant disease. **Phytochemistry**, v. 64, pp. 97-107, 2003.

WANDER, A. L. Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975–2005. **Informações Econômicas**, v. 37, p. 7-21, 2007.

WANG, Y.; OSATOMI, K.; NAGATOMO, Y.; YOSHIDA, A.; HARA, K. Purification, molecular cloning, and some properties of a manganese-containing superoxide dismutase from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 4, p. 289-296, 2011.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, p. 650–653, 2003.

WOOD, Z. A.; SCHRÖDER, E.; HARRIS, J. R.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Science**, v. 28, p. 32-40, 2003.

## 7. ANEXOS

**Anexo 01:** Sequências de cDNAs deduzidas dos diferentes genes membros da família multigênica das *PRXs*. Em azul são mostradas as sequências dos *primers* senso e antisenso.

>Vu1Cysprx

```
GAAGTGAGGTAAAGGTAAAGCTCTCAAATTTATCTACAATGCCAGGCCTTACCATCGGAGACACCATTCCCTGACC
TTCATGTTCAAACCACTCAAGGCAAAATCGAGCTTCATGCCTTCTGTAAGAATGGTTGGACCGTCCCTCTTTTCCC
ACCCAGGTGATTTTACCCCGGTTTGTACCACTGAGCTTGCCAAAATGGCTCAGCATTCCAGTGAGTTTTATAAAA
AAGGAGTGAAATTACTGGGTTTATCCTGTGATGATGTTGAATCTCACAATGAGTGGATCAAAGACAT TGAAGCCT
ACATTTTCAGGTTGCAAGGTGGATTATCCAATCATCTCTGATCCCAAGAGAGAAAATCATCAAGGAACTCAACATGG
TTGACCCTGAAGAGAAAAGACTCCACCGGAAACCTACCCCTCAGGGCTCTTCATATTGTGGGTCCAGATCTGAAGA
TCAAGCTGAGTTTTCTGTATCCTGCTACTACTGGGAGGAACATAGATGAGGTGCTGAGGGTGATAGAGTCCTTGC
AGAAGGCCTCTCAGTTC AAGGTGCAACACCAGCGAACTGGAAGCCAGGGGAGTCTGTTGTGATTTCTCCTAGTG
TCACCAACGAGCAAGCCAAAGACATGTTCCCTCAAGGCTTCGACACAGTCGATCTCCCATCCAACAAGAATATT
TGCGTCTCACAAAGTTTGATTTCCTCTAACAGCGAGGACGATACAACCTGTTTTTCATTTTCATGTATTTTCTGT
TTGGTTCAGTGTCTGTTTGTCTGATCTTTTCTCACCACAGCAATTATCTCGTGCTGTAGCTATCTGCTTGTAT
CTTTTGTTCACCTGCAGCTATGTCATACCCTCCACCATGTTTCTTTTAATTTTAACATTTTTGTTTTAATTTT
```

>Vu2CysprxA

```
GGATTGGATAGATACTGCTTTCTCCATCGTCCATTCTTTTCTATCTTACCTTCTCTGCCTCTCACTCACACACAC
ACTCTCTCTCTCACTCTCCCATGGCTTCCCTCCGCTCCTTCTGCTTCTCTCATCTCATCAAACCCTAACATTCT
CTTTTCTCCCAAATTCCTTCTTCTTCTTCTTCAATTTCTTCCATCTCCTTCCCAATTCCTCCAATTCCTTTT
CAAACCTTTACGCACTTCTCTTAATCCATCGTCTCGCGCTCTCAAACCCTTCGTTGCCAAGGCTTCGAGTGA
TCCATTAGTCGGAAACACAGCACCCGATTTTGAAGCAGAGGCTGTTTTTGATCAGGAGTTCATCAAGGTCAA
ACTATCTGAATATATTGGGAAAAAATATGTTATCCTCTTTTTCTACCCATTGGACTTCACATTCGTTTGTCCGAC
AGAAATCACCGCCTTCAGTGACCGTCATGCAGAGTTTGAGGAACTAAATACAGAGATTTTGGGTGTTTCAGTTG
ACAGTGTGTTTTACACCTTGCATGGTTCAAACCTGATAGAAAGTCGGGTGGTCTTGGCGACTTGAAGTATCCTT
TGATTTCTGATGTCACCAATCCATCTCAAATCTTATGGTGTTCATTCCCGATCAGGGGATTGCATTGAGAGG
ATTGTTTATTGACAAGGAAGGGTTATTTCAGCATTCTACCATTAACAACCTGGCCATTGGTAGAAGTGTGATG
AGACAAAGAGAACTCCAGGCCTTGCAGTATGTGCAGCAGAACCCAGATGAAGTTTGGCCAGCTGGGTGGAAG
CCCTGGTGAGAAAGTCCATGAAACCAGACCCTAAACTTAGCAAAGAGTACTTCTCTGCTATTTAGGGAGGATA
ATAGTTAAAGAGTATCAATTGCTCATCTGTATCAGTCAATGGTAATCTGTATTATGCAACGCAAGTTTATAAAGTTT
GATGCTGTTTCATGATTATATAAATGCATACTGTTGTGCAATGATTTTGGAAATGAATAATGTATCAATTTTACCTT
TACGGTTTTATGATGATGGAACAAAAGATGATCATGTTTTGTAGTCTTTATATAGCATTTCCTCCATTCAAAAG
TATGATTCTTCCATTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

>Vu2CysprxB

```
ACTGCTTCTCCGTCGTTCTGTTCTATCTTACTTCCCTCTGCCTCACACACAACCTCACTCTCCCATGGCTTC
TTTGGCTCCCTCTGCTTCTCTCATCTCCTCCAACCCTAACATTCCTTCTCTCCCAAATTCCTTCTTCTCCT
TTCTCTCTCTCCTTCCCAATTCCTCCCATTCACCTTTCAAACCTTTACGCACTTCTCTTAATCCTTCATCTCC
CGCTCGCAAAACCTTCGTTGCCAGGGCTTCGAGTGAACCTCCATTGGTTGGGAACATAGCTCCGGACTTTGAAGC
AGAGGCTGTTTTGATCAGGAGTTCATCAAGGTCAAACCTATCTGATTATATTGGAAAAAATATGTTATCCTCTT
TTTCTACCCATTGGATTTACATTCGTTTGTCCGACAGAAATCACTGCTTTCAGTGATCGGCATGCAGAGTTTGA
GGAATAAATACAGAGATTTTGGGTGTTTCAGTTGACAGTGTGTTTTACACCTTGCATGGGTTCAAACCTGATAG
AAAGTCGGGTGGTCTTGGCGACTTGAAGTATCCTTTGATTTCTGATATCACCAATCCATCTCGAAATCTTTTGG
TGTTCTCATTCCCGATCAGGGGATTGCATTGAGAGGATTGTTTATTGACAAGGAAGGTGTTATTTCAGCATT
TACCATTAACAACCTGGCCATCGGTAGAAAGTGTGATGAGACAAAGAGAACCTCCAGGCCTTGCATATGTGCA
GGAAAAACCGGATGAAGTTTGGCCAGCTGGGTGGAAGCCTGGTGAGAAAGTCCATGAAACCAGACCCTAAACTTAG
CAAAGAGTTCCTCTCTGCTATTTAGGGAGATTATAGTTAACAGTAGCAATTGCTCATCTGTATCAATTAATGGT
GTAAAAAGGAATTTTTGTTTTGCAACGCAAGTTTATGAAGTTTGTGATTGACAGTATCTACTTTCATGCTTATCTAA
ATGATTGTGCGTGCTGTTCAATGATTTTAAGAAATACGTATCAGTTTTTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

>VuPrxQ

GACTAGTTCTAGATCGCCACGCCACAAAGCGAATCTTCTATCATCACCAATAACCATTACCAGCCATTAACGCT  
 TTTCTTATCCTTCTCCTCTCTCTATCCTTACACCAAAGCCAATCTTCACTCACCATTTCTTCTTCGCATTG  
 TTCCCTACCAATGGCTTCCCTCTCTCCCTAACCCTATCTTCCCACCTTGCTTCGTTCTCACTCTCCCAACTA  
 CCCATCTTCCCAAAACCTCCCACTCTCTTCCACGCCTCAAATTTCTCAATTTTTTCGGTCTCAAGCTCTCTCATT  
 TCCCTCTTCCCTCAATCCCTCTTCTTTCTTCCCTCAGACCCCTCCATTTTCGCCAAGGTGAATAAAGGTTCAAAGCC  
 ACCGAATTTACACTCAAAGATCAGAATGGGAAGAATGTGAGTCTCTCCAGCTTCAAGGGAAAGCCAGTAGTTGT  
 GTATTTCTACCCTGCTGATGAGACCCCTGGCTGTACCAAACAGGCTTGTGCTTCAGGGATTTCGTATGAGAAGTT  
 CAAGAAAGCAGGAGCAGTGGTGTGGGATTAGTGGTGATGATGCTTCCCTCTCACAAGGCATTTGCCAGCAAATA  
 CAAACTTCCATTTACCTTGTGAGTGATGAGGGCAACAAGGTGAGAAAGGAATGGGGAGTGCCAGGTGATTTCTT  
 TGGATCATTGCCTGGAAGAGAGACTTATGTGATTGATAAAAAATGGGGTGGTCCAGCTTGTCTACAACAATCAATT  
 CCAACCAGAAAAGCATATTGATGAGACCCTGAAAATACTTCAGAGCCTTTGAGGCTTTTTGATCTTTTGTAACT  
 GTGAATTTAAGTTTGTAAAGCTCTGTAATTTATATAGCTGATTTTGGAGCCTTTGATCACATTTCTTGGAGGTGAT  
 GACATGTAGAGAGAAAAAGATTATAACCTCTCCGGATGGAAATAATGCCTTCATTTGCCAAAAATACAGTGAGAT  
 TATATATGTATCTTTTCCACTACAGTTTCTATATGATTTGAATTTGCTATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

>VuPrxIIBCD

GGAACACAACACAAATTCATTGTACATCGTTGCCATCACAATCATCGTCGTGAACATGGCTCCAATTGCTGTGGG  
 AGATGCTATTCCAGACGGCATTTTGGCTTATTTGGATGATGAAAACAAACCCCAAGCTGTTTCCATTCACTCTCT  
 TGCCGCTGGCAAGAAAGTTATCATCTTTGGTGTTCGGTGCCTTCACTCTACATGCAGCTTGAAGCACGTTCC  
 TGGCTTCATTGAGAGAGCAGAAGAGCTGAAAGGAAAGGTTGGATGAAATCATCTGTATCAGTGTGAATGACCC  
 TTTTGTGATGAACTCATGGGCGAAGACTTTCCAGAGAACAACATGTGAAGTTCCCTGCAGATGGTGTGCAAA  
 ATACACGAACGCACTTGGGCTTGAAGCTTGACCTGACAGAAAAGGCTTGGTGTAGGCTAGGAGGTTTGCAGT  
 GCTGGTGGATGACCTGAAGGTGAAGGTTGCCAATGTTGAAAGTGGAGGAGAGTTCACCGTCTCCAGTGTGAAGA  
 GATCATCAAGGCTCTTTAAACCCTTCGATGCTTCCCTCATAGATGCCAGAATTTGATGATGTTCTTTGATGTTCT  
 TACTGTGTTTGTGACTCTTTTATGCAAGAATTTTAGTAGAAAACGTTTTTCATAGATGTAATTTGTGTTGTGCT  
 TTCACAAGGGCATGATGTGGTGCATGTTATGGAAATAAATAAACTTTCTAGTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 AAA

>VuprxIIE

GTGGACTCTGAACCCAACAACGCTACTACCCCTTTCTTACCCAACACACAATTCATTCATTCTTCCAC  
 ATTTCAATTTCTCACCACAACTAAGTCCACACTGTCATCTATTCTCTGCAACTCAGTCACCATGGCTGC  
 ATCTCTAACCACATTCTCCAGGCTCATCTCTTCTACCACCGTCTCTCTCCTCCCTCCCAAAACCCCTCT  
 CTTCAAAATCTCTATTTCGCCTTCCCGCTCGCCGCCATGCCAAGCCCCCTTAGATTCTCCTCTTCTCC  
 TCCTCCACCATCACCCTGCCATCAGCGTTCGGCAACAAGCTCCCGGAGGCAACCTTTTCTACCTTGA  
 TT CAGATGGAGAGGTGAAGACACGACAGTGTTCGGAGTTGACGAAGGGGAAGAAGGCGGTGCTGTTTCG  
 CGGTGCCGGGCGCTTCACTCCACGTGCTCACAGAAGCACGTGCCGGGTTTCGTGGAGAAGTCGGGG  
 GAGCTGAAGGCGAAGGGGGTGGACACCATTGCATGCATTTTCGGTGAACGATGCTTTTCGTGATGAAGC  
 TTGGAAGGAGGACCTGAAGGTTAACGACGAGGTGCTCTTGTGTCGGATGGAAACGGAACGTTACAG  
 AAGCCATTGGGTGCGAGCTAGATCTCAGCGACAAGCCCGTTGGGTTGGGGTTAGGTCTAGGCGCTAC  
 GCTCTCTTGGCTGAGGATGGGTTGTGAAGCTCTTCAATTTGGAGGAAGGGGGTGCCTTCACTTTTCA  
 CGGCGCTCAGGACATTCTCGATGTCCTTTGAATTCGGTCTTGTAAATTTCTTCCGGATTTCCGCTTT  
 TCCTCGCACACGAGTTAGCCTTTTTTTTCAATTTGGTTTGGGTTTTGTTAATAACGTCGATGAATTAGA  
 TCTCAATGGTGTATCTCTGCCTGTAATAATAGAACCCTGTGCTGGTGTGAGCTTTTGTGCGATTG  
 GTTTTGAAGCTCTTCTTCTAATATCGTTTTTCTTAAAGAATGAGTAAATTAGAATTTGATTGAAGCT  
 TCTTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

>VuPrxIIFI

ATGGCTTCCGCTATGGTGAATCGAGTGGTTTCGGATCATGAAATCAGTGTCTGCAGTTCTTGGTACGAGGTTT  
 TACGCCAAGATTGCAACTGGGACTGACATAGTCTCTGCCGCATCCAATGTTTCTCTCCAGAAAGCTCGTACCTGG  
 GACGAGGGTCTTGTCTCCAAATTTCTCCACCCTCTCTCAAAGCATCTTCAAGGACAAGAAAGTTGTTATATTT  
 GGGCTCCCAGGTGCATACACAGGAGTTTGTTCAAAACAAACATGTTCTTCTTACAAAGAGAATATTGACAAGTTT  
 AAGGCTAAAGGGATAGATTCTGTTATTTGTGTGGCTATTAATGATCCGTATACGATGAATGCGTGGGCTGAGAAG  
 CTTCAAGCCAATGAGGCTATTGAGTTTTATGGGGACTTTGACGGGAGCTTTACAAGAGTTTGGAGTTGGTTACT  
 GATCTCTCGGGTGCATTACTTGAACACGATCTGAAAGATGGTCAGCATATGTGGTAGATGGAAAGGTTAAGGCT  
 CTTAATGTTGAAGAAGCTCCATCTGATGTTAAGTTTTCTGGTGCAGACACCATTTTGGGACAGATTTAA



---

>VuPrxIIFII

GGTGCATTCACAGGAGTCTGTTTCAGAAGAACATGTTCCAACCTACATGGATAATGCTGACAAGTTTAAGGCTAAG  
AGGGTCGATTFTGTTATCTGTGTTGCAATCAACGATCCGTATACTATGAATGAGTGGGCAGAGAAGCTTCAAGGC  
AAAGACACTATTGAGTTTATGGGGACTTTGATGGGAGCTTTCATAGAAGTTTGAATTAGTCACTGATCTCTCT  
AATGTTTTGCTTGGAACCTGTTCTGAAAGATGGTCAGCATATGTAGTAGATGGAGTGATTAAGGCTTTAAATGTT  
GAAGAAGATCCATCTGTTGTTACAGTTTCTGCTGCACAGACCATTTTGGAACAGATTTGAGGTTTCTGCTGGTTT

**Anexo 2:** Análise da pureza dos RNAs extraídos e da ausência de contaminação com DNA genômico das 48 amostras controle (*Cont*) e inoculado (*Cg*) oriundas de folhas primárias de feijão-de-corda. O teste foi realizado usando um *pool* contendo RNAs de cada amostra e testado com os *primers* *Vu2CysprxA*, *Vu2CysprxB*, *VuPrxIIFI* e *VuPrxIIFII* cujo desenho dos oligos não foi realizado na junção exón-éxon.

