



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

---

**DARCY MAYRA FURTADO GONDIM**

**BASES BIOQUÍMICAS DA INTERAÇÃO DO CAJUEIRO ANÃO  
PRECOCE COM O FUNGO *Lasiodiplodia theobromae* CAUSADOR DA  
RESINOSE**

FORTALEZA – CEARÁ

2010

DARCY MAYRA FURTADO GONDIM

---

Bases Bioquímicas da Interação do Cajueiro Anão Precoce com o Fungo  
*Lasiodiplodia theobromae* Causador da Resinose

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica.

Comitê de Orientação:

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Co-Orientador: Dr. José Emilson Cardoso

FORTALEZA - CEARÁ

2010

Esta tese de doutorado foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

---

Darcy Mayra Furtado Gondim

Tese aprovada em: 31 de março de 2010.

### **BANCA EXAMINADORA**

.....  
Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará  
(Orientador)

.....  
Dr. José Emilson Cardoso  
Embrapa/CNPAT  
(Examinador; Co-orientador)

.....  
Dr. Renato de Azevedo Moreira  
Universidade de Fortaleza  
(Examinador)

.....  
Dr. Francisco Paiva Campos  
Universidade Federal do Ceará  
(Examinador)

.....  
Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira  
Universidade Federal do Ceará  
(Examinador)

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima."

*Louis Pasteur*



## AGRADECIMENTOS

De forma **muito especial** ao meu orientador, José Tadeu Abreu de Oliveira, pela criteriosa orientação, exemplo, dedicação, amizade, apoio, incentivo, confiança e, principalmente, pela grande contribuição na minha formação científica.

Ao Dr. Emilson Cardoso, pelo privilégio na co-orientação deste trabalho, por ter me acolhido de forma receptiva em seu instituto, permitindo realização de parte dos experimentos desenvolvidos neste trabalho. Também, pelas sugestões, ensinamentos e excelente convivência.

Aos Professores Francisco Campo e Joaquim Albenísio pela aceitação em participar da avaliação deste trabalho, pelas valiosas sugestões e, também, pelo carinho sempre demonstrado.

Ao Professor Renato Moreira pela pronta aceitação em participar da avaliação deste trabalho, pelas valiosas sugestões e ensinamentos.

À Professora Ilka Vasconcelos pelos ensinamentos, apoio, amizade e carinho, sempre demonstrados.

À Profa. Célia Carlini por ter me recebido em seu laboratório de maneira acolhedora e por ceder a infra-estrutura e o equipamento para análises de espectrometria de massas.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular representados pela Profa. Norma Benevides que muito contribuíram para a minha formação intelectual e científica.

A todos que compõe a EMBRAPA, Agroindústria Tropical. Em especial ao grupo do Laboratório de Fitopatologia.

Aos colegas Paulo e Jéferson pelo total apoio nas análises de espectrometria de massas e pela ótima convivência.

Com carinho, ao amigo Hélio pelos vários anos de amizade e pelas brincadeiras marcantes.

Aos amigos do laboratório Alexandra, Fredy, Vladimir, Rodolpho, Anna Li, Pedro, Jonnathan, David, Ana Lu, Lara e Alessandra pela companhia, auxílio e momentos de descontração.

Ao grupo do Laboratório de Proteínas Tóxicas Vegetais (Daniele, Hermógenes, Henrique, Adê, Mimi, Helen, Raquel e todos os outros) pelo apoio e companheirismo sempre prestados.

Ao secretário da Coordenação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Márcio, pela atenção sempre prestada.

De forma muito especial, à minha mãe, Maria Olinda, pela dedicação em toda a minha formação, que me possibilitou chegar até aqui.

Com carinho agradeço meu pai, Antonio Brasileiro, e meu irmão, Fernando Antônio pelo carinho e incentivo.

À minha avó, Maria Darci Brito, que sempre me apoiou durante todos os momentos da minha vida.

A toda minha família e amigos.

A todos que contribuíram para a execução deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (**DBBM-UFC**) em cujos laboratórios grande parte desta pesquisa foi realizada.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (**CAPES**), pela bolsa de Pós-Graduação concedida à autora, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **EMBRAPA**, Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, onde foi realizado parte dos experimentos deste trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**FUNCAP**), através de convênio com o programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.



## RESUMO

### **BASES BIOQUÍMICAS DA INTERAÇÃO DO CAJUEIRO ANÃO PRECOCE COM O FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*, CAUSADOR DA RESINOSE.**

---

No Brasil, a cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) destaca-se pela grande área cultivada e elevada produção de castanha, estando o estado do Ceará no patamar de principal produtor nacional e exportador. Várias doenças afetam o cajueiro, trazendo enormes perdas econômicas. Dentre elas, a resinose, causada pelo fungo *L. theobromae*, é, atualmente, a doença mais importante do cajueiro nas condições do semi-árido do Nordeste brasileiro. Este trabalho teve o objetivo de detectar diferenças bioquímicas entre dois clones de cajueiro anão, CCP 76 e BRS 226, suscetível e resistente, respectivamente, à resinose, a fim de compreender os mecanismos de defesa do cajueiro frente à infecção por este fungo. Duas diferentes abordagens foram utilizadas: primeiramente, realizou-se a detecção de diversos compostos (fenóis, taninos e peróxido de hidrogênio) e enzimas (dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato, catalase, peroxidase do guaiacol, fenilalanina amônia liase,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase) relacionados à defesa vegetal; em um segundo momento, foi feito um estudo proteômico, através da realização de eletroforeses bidimensionais, seguida de identificação das proteínas de interesse por espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática. Todas as análises foram realizadas no tecido do caule, local de infecção do patógeno, tanto em plantas saudáveis e quanto infectadas, em diversos períodos após a infecção. Os resultados aqui obtidos demonstram que duas enzimas de ação antifúngica analisadas,  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, acumularam diferencialmente nos contrastantes clones. Atividades mais elevadas destas enzimas, em especial a quitinase, foram observadas no clone resistente, tanto em tempos recentes após a infecção, em mudas, quanto em estágio avançado da doença, em plantas adultas cultivadas no campo. Também, há indícios que peróxido de hidrogênio seja mais acumulado no clone suscetível, facilitando, assim, o estabelecimento deste patógeno, que possui hábitos necrotróficos. Com relação à análise proteômica, primeiramente foi estabelecido um protocolo eficaz para a extração de proteínas de caule do cajueiro, um tecido vegetal altamente recalcitrante. Por meio das técnicas de eletroforese bidimensional, espectrometria de massas (nano-UPCL-ESI-Q-TOF) e ferramentas de bioinformática foi possível a identificação de 59 diferentes *spots* em amostras de ramos de plantas adultas. Aproximadamente, 50% desses *spots* são proteínas relacionadas com respostas à estresse: proteínas *heat shock* de baixa massa molecular (sHSPs), superóxido dismutase,  $\beta$ -1,3-glucanase, isoflavona redutase, peroxidases, catalases, ascorbato peroxidase, além de outras. Este resultado está de acordo com a excelente adaptação do cajueiro às condições do semi-árido nordestino. Esta informação é aplicável, principalmente, para os clones CCP 76 e BRS 226, uma vez que ambos têm boa produtividade neste clima adverso. Diversas proteínas diferencialmente expressas foram detectadas. A identidade de algumas delas demonstrou serem sHSPs, superóxido dismutase,  $\beta$ -1,3-glucanase e peroxidases do guaiacol e do ascorbato. Contudo, o aumento destas proteínas ocorreu tanto no clone suscetível quanto no resistente, não sendo, portanto, possível correlacioná-las com a característica de resistência do cajueiro BRS 226. Novos estudos demonstrando a expressão temporal destas proteínas poderão permitir novas conclusões a respeito da interação cajueiro-*L. theobromae*. Este é o primeiro estudo que buscou conhecer moléculas que estejam ligadas às respostas de defesa do cajueiro em resposta à infecção pelo *L. theobromae*.

**Palavras-chave:** *Anacardium occidentale*, Resinose, defesa vegetal



## ABSTRACT

### **BIOCHEMICAL BASIS OF THE INTERACTION BETWEEN DWARF CASHEW AND FUNGUS *Lasiodiplodia theobromae*, AGENT OF GUMMOSIS.**

---

In Brazil, the cashew (*Anacardium occidentale* L.) crop stands out for large cultivated area and high nut yield, with the state of Ceara in the level of the main national producer and exporter. Several diseases infect the cashew plant, causing huge economic losses. Among them, the gummosis caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae*, is currently the most important disease of cashew in the semi-arid conditions of north-eastern Brazil. This study aimed to detect biochemical differences between two cashew clones, CCP 76 and BRS 226, respectively, susceptible and resistant to gummosis, in order to understand the cashew defense mechanisms against the infection by this fungus. All tests were performed on stem tissue, the local of primary infection, both in healthy plants and the infected by the pathogen in different periods after infection. Two different approaches were used: first, a detection of various compounds (phenols, tannins and hydrogen peroxide) and enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase, phenylalanine ammonia lyase,  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase) related to plant defense was made; in a second stage, a proteomic study was done by performing two-dimensional electrophoresis followed by identification of the proteins of interest by mass spectrometry and bioinformatics tools. Our results show that the two antifungal enzymes analyzed, glucanase and chitinase, accumulated differentially in contrasting clones. Higher activities of these enzymes, especially chitinase, were observed in the resistant clone, both in recent times after infection in seedlings, and in advanced stages of gummosis in adult plants grown in the field. Also, there is evidence that susceptible clone accumulated more  $H_2O_2$ , thus facilitating the establishment of this pathogen, which has necrotrophic habits. With regard to proteomic analysis, was first established an effective protocol for protein extraction of cashew stem, a highly recalcitrant plant tissue. Through the techniques of two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry (nano-ESI-UPCL-Q-TOF) and bioinformatics tools allowed the identification of 59 different spots in samples from branches of adult plants. Approximately 50% of these spots are proteins related to stress responses: heat shock proteins (sHSPs), superoxide dismutase,  $\beta$ -1,3-glucanase, isoflavone reductase, peroxidase, catalase, ascorbate peroxidase, and others. This result is consistent with the excellent fit of cashew to the semi-arid. This information applies mainly to clones CCP 76 and BRS 226, since both have good productivity in this adverse climate. Several differentially expressed proteins were detected. The identity of some of them were shown to be sHSPs, superoxide dismutase,  $\beta$ -1,3-glucanase and guaiacol peroxidase and ascorbate. However, the increase in these proteins occurred in both the resistant and susceptible clone, and is not therefore possible to correlate them with the characteristic resistance of cashew BRS 226. Further studies demonstrated the temporal expression of these proteins may allow new conclusions about the interaction cashew-*L. theobromae*. This is the first study that aimed to discover molecules that are linked to the defense response of cashew in response to infection by *L. theobromae*.

**Key-words:** *Anacardium occidentale*, Gummosis, Plant defense

## LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
<b>Figura 1</b>	Mapa do mundo destacando a faixa territorial – tropical – onde há grande ocorrência do cajueiro, tanto como planta cultivada como espontânea.	03
<b>Figura 2</b>	Aspecto visual da planta e do pedúnculo dos clones de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226.	08
<b>Figura 3</b>	Algumas espécies vegetais hospedeiras do <i>L. theobromae</i> no Brasil e no mundo.	10
<b>Figura 4</b>	Plantas de cajueiro anão precoce exibindo sintomas da resinose: (A) Aspecto dos ramos apresentado sintomas típicos da doença no caule; (B) Detalhe de uma área do caule infectado – exibindo rachaduras, necrose e eliminando resina; e (C) planta em estágio mais avançado da doença, com um ramo inteiro morto.	12
<b>Figura 5</b>	Imagens ilustrando a produção de mudas; (a) Plantio da castanha para formação do porta-enxerto; (b) Aspecto das mudas aptas a serem enxertadas; (c) produção das mudas em viveiro. E, em (d) está exibido a manutenção das mudas em sala de crescimento sob condições controladas.	31
<b>Figura 6</b>	Testes preliminares para determinação do melhor método (a), tempo (b) e tampão de extração de proteínas do caule de cajueiro anão precoce.	43
<b>Figura 7</b>	Teste preliminar para determinação do melhor tampão de extração.	44
<b>Figura 8</b>	Teor constitutivo de fenóis solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	46
<b>Figura 9</b>	Teor constitutivo de taninos em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	46
<b>Figura 10</b>	Teor constitutivo de peróxido de hidrogênio em caule de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	47
<b>Figura 11</b>	Teor constitutivo de proteínas solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	47



<b>Figura 12</b>	Atividade constitutiva da enzima dismutase do superóxido em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	48
<b>Figura 13</b>	Atividade constitutiva da enzima peroxidase do ascorbato em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	48
<b>Figura 14</b>	Atividade constitutiva da enzima peroxidase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	49
<b>Figura 15</b>	Atividade constitutiva da enzima fenilalanina amônia liase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	49
<b>Figura 16</b>	Atividade constitutiva da enzima $\beta$ -1,3-glucanase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	50
<b>Figura 17</b>	Atividade constitutiva da enzima quitinase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	50
<b>Figura 18</b>	Teor de fenóis solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	52
<b>Figura 19</b>	Teor de taninos em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	52
<b>Figura 20</b>	Teor de peróxido de hidrogênio em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	53
<b>Figura 21</b>	Teor de proteínas solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	53

<b>Figura 22</b>	Atividade da enzima dismutase do superóxido em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. *denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	55
<b>Figura 23</b>	Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	55
<b>Figura 24</b>	Atividade da enzima peroxidase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	56
<b>Figura 25</b>	Atividade da enzima fenilalanina amônia liase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	56
<b>Figura 26</b>	Atividade da enzima $\beta$ -1,3-glucanase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	57
<b>Figura 27</b>	Atividade da enzima quitinase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	57
<b>Figura 28</b>	Teor de fenóis solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	59
<b>Figura 29</b>	Teor de taninos em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	59
<b>Figura 30</b>	Teor de peróxido de hidrogênio em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	60



<b>Figura 31</b>	Teor de proteínas em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	60
<b>Figura 32</b>	Atividade da enzima dismutase do superóxido em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	61
<b>Figura 33</b>	Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	61
<b>Figura 34</b>	Teor da enzima peroxidase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	62
<b>Figura 35</b>	Teor da enzima fenilalanina amônia liase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	62
<b>Figura 36</b>	Teor da enzima $\beta$ -1,3-glucanase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	63
<b>Figura 37</b>	Teor da enzima quitinase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com <i>L. theobromae</i> . Barras indicam desvio padrão. * denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	63
<b>Figura 38</b>	Teor de fenóis em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	66
<b>Figura 39</b>	Teor de taninos em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	66
<b>Figura 40</b>	Teor de peróxido de hidrogênio em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	67

<b>Figura 41</b>	Teor de proteínas em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	67
<b>Figura 42</b>	Atividade da enzima dismutase do superóxido em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	68
<b>Figura 43</b>	Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	68
<b>Figura 44</b>	Atividade da enzima peroxidase do guaiacol em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	69
<b>Figura 45</b>	Atividade da enzima $\beta$ -1,3-glucanase em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	70
<b>Figura 46</b>	Atividade da enzima quitinase em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	70
<b>Figura 47</b>	Teor de proteínas extraídas através dos diferentes métodos (descritos no texto) de preparação de caule de cajueiro para 2D-PAGE. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.	89
<b>Figura 48</b>	Comparação dos perfis de géis bidimensionais de proteínas do caule de cajueiro extraídas por diferentes métodos (descritos no texto). Visão bidimensional (acima) e tridimensional (abaixo) Em (a) Método 3; (b) Método 4; (c) Método 5.	91
<b>Figura 49</b>	Distribuição por ponto isoelétrico (A) e massa molecular relativa (B) das proteínas do caule de cajueiro, após 2D-PAGE extraídas por diferentes métodos (descritos no texto).	92
<b>Figura 50</b>	Gel bidimensional de proteínas do caule de cajueiro extraídas pelo Método 4 (descrito no texto). Em detalhe (gel menor), a imagem do mesmo gel com <i>spots</i> selecionados (programa ImageMaster).	93



<b>Figura 51</b>	Comparação do perfil de géis bidimensionais de proteínas do caule de cajueiro extraídas pelo método 4 (descrito no texto) e separadas em diferentes malhas do gel da segunda dimensão: (a) 12,5%; (b) Método 14% e (c) 15%.	94
<b>Figura 52</b>	Perfis dos géis bidimensionais de proteínas extraídas de ramos de cajueiro adulto, dos clones CCP 76 (acima) e BRS 226 (abaixo), na condição sadio (a) e apresentando sintomas da resinose (b).	96
<b>Figura 53</b>	Indicação dos spots submetidos à análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF retirados dos géis bidimensionais de ramos de cajueiro adultos clone <u>CCP 76</u> , na condição sadio (esquerda) e apresentando sintomas da resinose (direita).	98
<b>Figura 54</b>	Indicação dos spots submetidos à análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF retirados dos géis bidimensionais de ramos de cajueiro adulto clone <u>BRS 226</u> , na condição sadio (esquerda) e apresentando sintomas da resinose (direita).	99

## LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
<b>Tabela 1</b> Dados de produtividade do cajueiro por unidade de federação.	04
<b>Tabela 2</b> Principais características dos clones de cajueiro anão precoce CCP 76 e BRS 226.	07
<b>Tabela 3</b> Identificação das proteínas do caule de cajueiro anão precoce adulto, através de análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF e ferramentas de bioinformática.	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
2-ME	2- $\beta$ -mercaptoetanol
ACN	Acetonitrila
APX	Peroxidase do ascorbato
CAT	Catalase
CBB	Coomassie Brilhante Blue
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate
DTT	Ditiotreitol
QUI	Quitinase
DAE	Dias após enxertia
DAI	Dias após inoculação
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ESI	Ionização por eletrospray
GLU	$\beta$ -1,3-glucanase
HAI	Horas após inoculação
HR	Resposta hipersensitiva
HSPs	proteínas <i>heat-shock</i>
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	Gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida
MS	Espectrometria de massa
NBT	<i>p</i> -nitro blue tetrazolium
PAL	Fenilalanina amônia liase
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	Fluoreto de Fenilmetil sulfonil
PR	Proteínas relacionada à patogênese
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
POX	Peroxidase do guaiacol
Q-TOF	Espectrômetro de massa quadrupolo – <i>time-of-flight</i>
QUI	Quitinase
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida
SOD	Dismutases de superóxido
TCA	Ácido tricloroacético
UPLC	Sistema de cromatografia líquida de ultraperformance

## SUMÁRIO

	Página
<u>RESUMO</u>	vii
<u>ABSTRACT</u>	viii
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	ix
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xv
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	xvi
<b>CAPÍTULO 1 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	
1 Revisão de literatura	2
1.1 <i>Cajueiro</i>	2
1.2 <i>Lasiodiplodia theobromae (Resinose)</i>	9
1.3. <i>Defesa das plantas</i>	13
1.4 <i>Marcadores protéicos no estudo das interações planta – patógeno</i>	18
2.1 Hipótese	25
2.2 Objetivo geral	25
<b>CAPÍTULO 2 – ANÁLISE COMPARATIVA DE METABÓLITOS LIGADOS À DEFESA VEGETAL ENTRE OS CLONES DE CAJUEIRO CCP 76 E BRS 226.</b>	
1 Caracterização do problema e Justificativa	27
2 Objetivos	28
2.1 <i>Geral</i>	28
2.2 <i>Específicos</i>	29
3 Materiais	29
3.1 <i>Material biológico</i>	29
3.2 <i>Reagentes</i>	30
4 Metodologias	32
4.1 <i>Inoculação das mudas de cajueiro</i>	32
4.2 <i>Experimento I – Avaliação bioquímica constitutiva dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226</i>	32
4.3 <i>Experimento II – Respostas bioquímicas imediatas dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, à infecção pelo L. theobromae</i>	33
4.4 <i>Experimento III – Respostas bioquímicas tardias dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, à infecção pelo L. theobromae</i>	33



<b>4.5 Experimento IV – Análise bioquímica comparativa de ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadios e apresentando sintomas da resinose</b>	34
<b>4.6 Teste preliminar para obtenção do extrato enzimático</b>	34
<b>4.7 Processamento do material biológico</b>	35
<b>4.8 Extração do peróxido de hidrogênio, fenóis solúveis e enzimas a partir do caule de cajueiro</b>	35
<b>4.8 Análises bioquímicas</b>	36
4.8.1 Teor de fenóis totais e taninos	36
4.8.2 Teor de peróxido de hidrogênio	37
4.8.3 Teor de Proteínas solúveis	37
4.8.4 Determinações enzimáticas	37
<b>5 Resultados</b>	41
<b>5.1 Testes preliminares e processamento da amostra</b>	41
<b>5.2 Experimento I – Avaliação bioquímica constitutiva dos contrastantes clones de cajueiro, CCP 76 e BRS 226</b>	45
<b>5.3 Experimento II – Respostas bioquímicas imediatas dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, à infecção pelo <i>L. theobromae</i></b>	51
<b>5.4 Experimento III – Respostas bioquímicas tardias dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, em reposta à infecção pelo <i>L. theobromae</i></b>	58
<b>5.5 Experimento IV – Análise bioquímica comparativa de ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadios e apresentando sintomas da resinose</b>	64
<b>6 Discussão</b>	71
<b>7 Considerações finais</b>	75

### **CAPÍTULO 3 - ESTUDO PROTEÔMICO DA INTERAÇÃO DO CAJUEIRO ANÃO PRECOCE (*Anacardium occidentale*) COM O FUNGO *Lasiodiplodia theobromae*, CAUSADOR DA RESINOSE.**

<b>1 Caracterização do problema e Justificativa</b>	78
<b>2 Objetivos</b>	80
2.1 Geral	80
2.2 Específicos	80
<b>3 Materiais</b>	81
3.1 Material biológico	81
3.2 Reagentes	81
<b>4 Metodologias</b>	81
4.1 Estabelecimento do protocolo de extração de proteínas do caule de cajueiro compatível	76

<i>com análise proteômica</i>	
4.1.1 Método 1	82
4.1.2 Método 2	82
4.1.3 Método 3	83
4.1.4 Método 4	83
4.1.5 Método 5	84
4.2 <i>Análise proteômica de ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadios e apresentando sintomas típicos da resinose</i>	85
4.3 <i>Dosagem de proteínas e Eletroforese bidimensional</i>	86
4.4 <i>Processamento dos spots, Espectrometria de massas e Identificação das proteínas de interesse</i>	87
<b>5 Resultados</b>	88
5.1 <i>Estabelecimento do protocolo de extração de proteínas do caule de cajueiro compatível com análise proteômica</i>	88
5.2 <i>Análise proteômica em ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadio e apresentando sintomas típicos da resinose</i>	91
<b>6 Discussão</b>	105
<b>7 Considerações finais</b>	108
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	109





# Capítulo 1

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

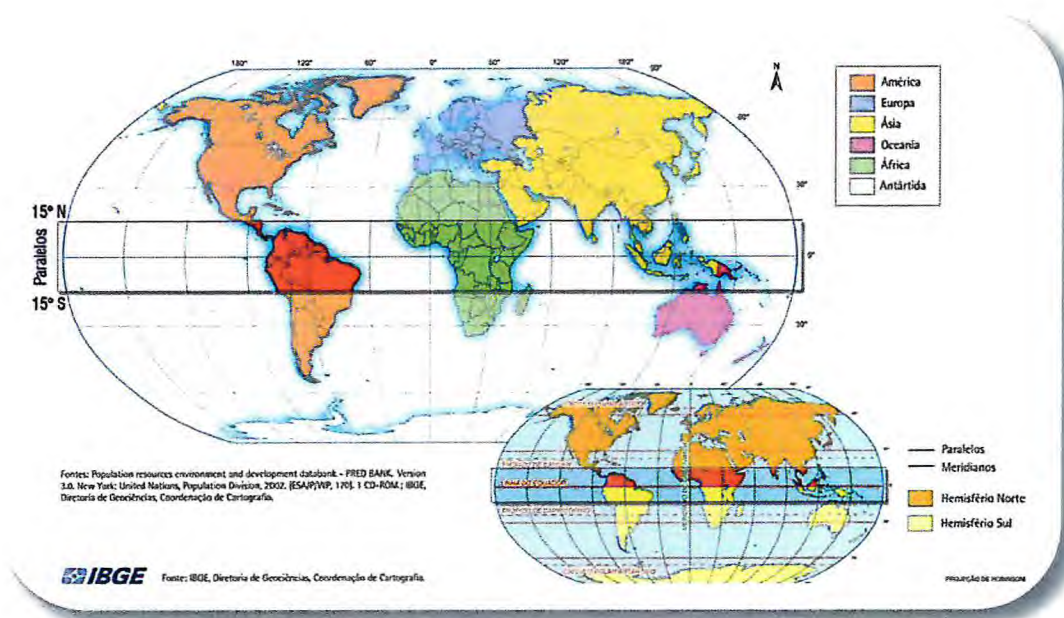
## 1 Revisão de literatura

### 1.1 Cajueiro

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., pertence à família Anacardiaceae, que compreende cerca de 60 a 70 gêneros, 400 a 600 espécies, composta por árvores e arbustos, de regiões tropicais e subtropicais. É uma planta perene, de ramificação baixa e porte médio, com copa bastante desenvolvida; suas folhas são simples, inteiras, alternadas, de aspecto subcoriáceo; o fruto é um aquênio reniforme que se prende à panícula por um pedúnculo hipertrofiado; o caule é, comumente, curto, grosso, tortuoso e ramificado; as flores são pequenas, pálidas, avermelhadas ou púrpuras, com corola e cálice pentâmeros, dispostas em panículas terminais, com flores masculinas (estaminadas) e hermafroditas (perfeitas) (Lima, 1988; Barros, 1993).

Esta espécie é encontrada em quase todo o mundo tropical (Figura 1), tanto como planta espontânea ou cultivada, sendo o principal centro de diversidade do gênero *Anacardium*, a região Amazônica. Contudo, a maior diversidade do cajueiro está no Nordeste brasileiro, onde pode ser encontrada em diversos ecossistemas (Crisóstomo *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2007).

O cajueiro é considerado uma das mais importantes espécies cultivadas nas regiões tropicais e ocupa, no mundo, uma área de 4,14 milhões de hectares. Atualmente, as maiores áreas plantadas estão no Vietnã, Índia, Nigéria e no Brasil, de onde esta espécie é originária. Esta planta está dispersa em quase todo território brasileiro, mas sua exploração está fortemente concentrada na região Nordeste, responsável por cerca de 95% da produção nacional, destacando-se o estado do Ceará como maior produtor (Tabela 1). A importância social e econômica da cajucultura para as regiões produtora, pode ser observada pelas divisas, 225 milhões de dólares anuais, e pelo grande número de empregos, aproximadamente 280 mil, gerados por essa cultura no Brasil (Melo, 2002; Paiva *et al.*, 2003; FAO - *Food and Agriculture Organization*, 2010).



**Figura 1.** Mapa do mundo destacando a faixa territorial – tropical – onde há grande incidência do cajueiro, tanto como planta cultivada como espontânea (Fonte: FBB - FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL, 2010).



**Tabela 1.** Dados de produtividade do cajueiro por unidade de federação.

<b>Área plantada, área colhida e produção (ref. fevereiro de 2010)</b>				
<b>Brasil e Estados</b>	<b>Safra</b>	<b>Área plantada (ha)</b>	<b>Área colhida (ha)</b>	<b>Produção (t)</b>
<b>Brasil</b>	<b>2009</b>	784.515	747.094	211.920
	<b>2010</b>	793.674	772.432	289.944
<b>Maranhão</b>	<b>2009</b>	19.608	18.777	6.512
	<b>2010</b>	19.607	18.777	6.422
<b>Piauí</b>	<b>2009</b>	184.145	170.545	42.963
	<b>2010</b>	193.984	193.984	71.722
<b>Ceará</b>	<b>2009</b>	410.676	396.538	104.421
	<b>2010</b>	412.843	401.379	153.904
<b>Rio Grande do Norte</b>	<b>2009</b>	128.227	120.590	43.772
	<b>2010</b>	125.842	118.295	43.611
<b>Paraíba</b>	<b>2009</b>	7.969	7.905	3.152
	<b>2010</b>	8.112	8.058	3.024
<b>Pernambuco</b>	<b>2009</b>	8.118	7.260	5.827
	<b>2010</b>	8.118	7.260	5.716
<b>Bahia</b>	<b>2009</b>	25.772	25.479	5.273
	<b>2010</b>	25.168	24.679	5.545

Fonte: Oliveira, 2010.

Os principais produtos de expressão econômica mundial advindos do cajueiro são a amêndoa da castanha e o líquido da casca da castanha. Porém, nos últimos anos, houve um aumento substancial do consumo do caju *in natura* no mercado interno brasileiro. E, também, um expressivo aumento nas vendas de diversos produtos derivados do caju, como o sucos, doces e refrigerantes. Somando-se ao aspecto econômico, o caju e seus derivados apresentam elevada importância alimentar, por apresentar altos teores de vitamina C, fósforo, ferro e cálcio (Freire *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 1998; Oliveira, 2008).

Apesar da importância alcançada pela cajucultura nos dias de hoje, originalmente, sua exploração ocorria por extrativismo, com a utilização de técnicas rudimentares de manejo. Porém, com os resultados econômicos expressivos advindos da comercialização dos seus produtos, buscou-se sistematizar seu cultivo realizando-se investimentos tanto na tecnologia agrícola, como na industrialização e na pesquisa. Dentre os manejos aplicados, podemos destacar alguns: preparo e adubação do solo, controle de ervas daninhas, pragas e doenças, plantio de forma adequada (poda, espaçamentos, manejo da água etc) e processo otimizados de colheita e pós-colheita. Dessa forma, sua produtividade foi significativamente aumentada. Nesse contexto, é importante destacarmos o melhoramento genético dos pomares como um fator crítico para se obter incrementos na produtividade desta cultura. Atualmente, a seleção de clones na cajucultura tem sido orientada para obtenção de plantas de porte baixo, pedúnculo com características desejáveis de coloração, sabor, textura, maior período de conservação, consistência e teor de taninos, castanha de tamanho e peso adequados e facilidade de descastanhamento (Barros *et al.*, 1998; Crisóstomo *et al.*, 1999; FBB, 2010).

Quanto à sua variabilidade genética, o cajueiro é agrupado em dois tipos – comum e anão – denominados em função do porte. O cajueiro anão precoce vem substituindo o cajueiro comum por apresentar boa produtividade, precocidade da colheita, facilidade na condução dos pomares e maior uniformidade da castanha, do pedúnculo e da produção (Rossetti e Aquino, 2002; Paiva *et al.*, 2003).

Os primeiros e mais difundidos clones de cajueiro anão no país, CCP 06 (lançado em 1983), CCP 09 (lançado em 1987), CCP 76 (lançado em 1983) e CCP 1001 (lançado em 1987), foram obtidos a partir de introduções de plantas da região litorânea do Nordeste no Campo Experimental de Pacajus – CE, da Embrapa Agroindústria Tropical. Em seguida, o uso de diferentes métodos de melhoramento genético (método do policruzamento, seleção entre e dentro de progênies e hibridação inter e intraespecífica) resultou na obtenção dos



clones Embrapa 50 (lançado em 1996), Embrapa 51 (lançado em 1996), BRS 189 (lançado em 2000), BRS 226 (lançado em 2002) e BRS 265 (lançado em 2005). E, mais recentemente, a Embrapa Agroindústria Tropical lançou dois novos clones: o BRS 274, primeiro clone de cajueiro comum para o plantio comercial, e o BRS 275, primeiro clone de cajueiro híbrido, gerado a partir do cruzamento do cajueiro comum com um clone de cajueiro anão precoce (Paiva *et al.*, 2003; Paiva e Barros, 2004; Oliveira, 2008; FBB, 2010). Assim, podemos concluir que existem poucos clones comerciais de cajueiro anão associados à base genética estreita que originou estes clones, caracterizando uma situação indesejável, não somente pelas dificuldades para obtenção de novos ganhos de seleção, mas, também, pelos riscos de vulnerabilidade genética (Almeida *et al.*, 1992; Barros *et al.*, 1993).

Algumas características dos clones CCP 76 e BRS 226, alvos desse estudo, estão listadas na Tabela 2. O aspecto visual da planta e do pedúnculo de ambos estão demonstrados na Figura 2.

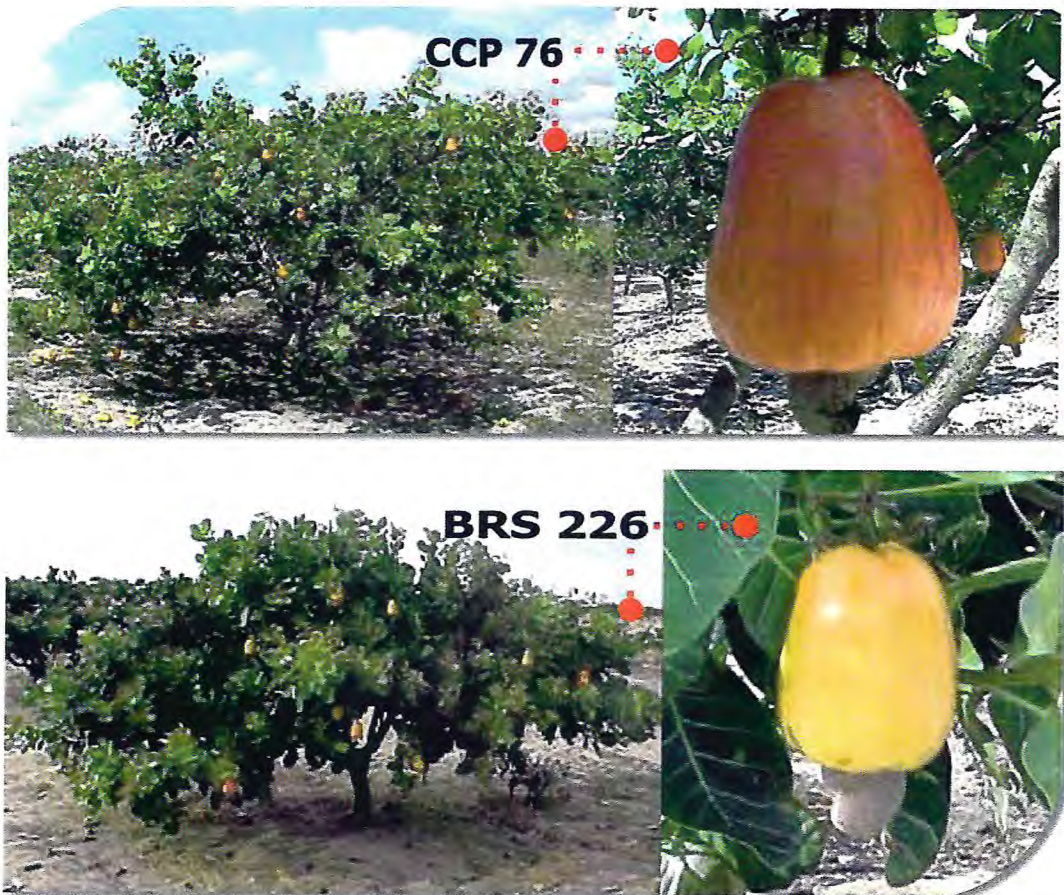
Embora, com o advento da cultura do cajueiro anão precoce, tenha havido um acréscimo significativo da área cultivada do cajueiro, sua produtividade ainda permanece em níveis baixos, reflexo da deficiente infra-estrutura de produção na maioria das áreas cultivadas, das secas cíclicas nas principais regiões produtoras, ausência de tratamentos culturais adequados e, em especial, da ocorrência de pragas e doenças em todas as fases do desenvolvimento da planta (Freire e Barguik, 2001; Melo, 2002; Oliveira, 2002).

**Tabela 2.** Principais características dos clones de cajueiro anão precoce CCP 76 e BRS 226.

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>CCP 76</b>	<b>BRS 226</b>
Condição de plantio recomendada	Plantio de sequeiro e irrigado	Plantio de sequeiro
Área de plantio	Litoral e transição	Semi-árido e cerrado
Altura da planta no 3º ano (m)	1,2	1,24
Diâmetro da copa no 3º ano (m)	2,36	2,20
Peso da castanha (g)	8,6	9,75
Peso da amêndoa (g)	1,8	2,7
Peso do pedúnculo (g)	135	102,6
Coloração do pedúnculo	Laranja-escuro	laranja-clara
Produção de castanha no 3º ano (kg/ha)	85	75

Fontes: Paiva, *et al.*, 2002; Embrapa, 2005; Oliveira, 2010.





**Figura 2.** Aspecto visual da planta e do pedúnculo dos clones de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226 (Fonte: Embrapa, 2005).



## 1.2 *Lasiodiplodia theobromae* (Resinose)

O cajueiro pode ser afetado por mais de 20 doenças, a maioria delas causada por fungos. Estima-se que os prejuízos econômicos decorrentes deste problema estejam em torno de 40%. Destacam-se, como as principais doenças de importância econômica, a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*), o mofo-preto (*Pilgeriella anacardii*), a requeima (*Phytophthora hevea* e *P. nicotiana*), o tombamento das plântulas (*Pythium splendens*) e a resinose (*L. theobromae*) (Freire *et al.*, 2002; Melo, 2002).

O fungo *L. theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl.(= *Botryodiplodia theobromae* Pat.) pertence a classe dos Coelomicetos e representa o estado assexual de *Botryosphaeria rhodina* (Berk & Curtis). As colônias têm coloração do cinza ao preto, com micélio macio e abundante e seu reverso variando do fosco ao preto. Os picnídios são simples ou compostos, muitas vezes agregados e estromáticos. Os conídios são liberados a partir dos picnídios e, inicialmente, apresentam-se hialinos, unicelulares e granuloso; quando maduros, são septados, amarronzados e longitudinalmente estriados (Punithalingam, 1976; Cilliers, 1993).

O *L. theobromae* é um patógeno cosmopolita, polífago e oportunista. Sua infecção, geralmente, está associada com plantas estressadas ou submetidas a ferimentos (Britton e Hendrix, 1986; Baird e Carling, 1998). É capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais, mas seus principais hospedeiros são plantas lenhosas (Mohali *et al.*, 2005). Na figura 3 estão exibidas as principais plantas hospedeiras atacadas por este fungo, no Brasil e no mundo.

Sua infecção pode causar sintomas variados, como tombamento de plântulas, cancos em diversos tecidos, podridão de raízes, frutos e sementes, gomose, murcha e queima foliar, além de outros (Punithalingam, 1976; Freire *et al.*, 2004).

A despeito de ser considerado um patógeno fraco (Holliday, 1980), nos últimos anos vem aumentando o número dos seus hospedeiros e a severidade da doença em diversas culturas brasileiras, em especial no Nordeste. Esse efeito poderia estar sendo causado por pressões ambientais, especialmente nas regiões semi-áridas, onde as condições climáticas lhes são favoráveis e uniformes – temperaturas elevadas, em média 28 °C; umidade relativa baixa, em torno de 60%; e baixa precipitação pluviométrica (Tavares, 2003; Freire *et al.*, 2004).

Demonstrativo de <i>Botryodiplodia theobromae</i> no Brasil e no Mundo como patógeno em <b>pré-colheita</b> , pós-colheita, <b>sementes</b> e em <b>madeira</b>			
BRASIL	REGIÃO NORTE	Amazônia Pará	Cupuaçuzeiro Seringueira
	REGIÃO NORDESTE	Alagoas Bahia  Ceará Pernambuco  Piauí Sergipe	Mamoeiro Cacaueiro • • ; Pupunha; Mamoneira Sisaleira; Mangueira; Videira Graviola • ; Aleia; Siriguela; Cajueiro Mangueira • ; Videira; Abacateiro; Goiabeira; Coqueiro; Citrus; Tomareira; Bananeira; Aceroleira Palma; Laranja; Limoeiro; Maracujazeiro; Pimentão; Melancia e Cajueiro Aroeira; Maracujá; Coqueiro; Gravioleira;
	REGIÃO CENTRO OESTE	Distrito Federal Goiás	Espécies nativas Seringueira
	REGIÃO SUDESTE	Minas Gerais  São Paulo	Algodão; Melancia; Maracujá • ; Fruteiras Tropicais • Manga; Sorgo; Videira
	REGIÃO SUL	Paraná	Pau-Alho; Cará-Inhame
	MUNDO	ÁFRICA	África do Sul Egito Nigéria
AMÉRICA DO NORTE		Estados Unidos México	Macieiras; Citrus; Azeitoneira; Limão; Mangueiras
AMÉRICA CENTRAL		Costa Rica Jamaica Honduras	Pupunha; Bananeiras Bananeiras
AMÉRICA DO SUL		Peru Venezuela	Tuberosas Mamão •
ÁSIA		Índia	Manga; Sorgo; Milheito; Grão-de-Bico; Feijão Guandú; Amendoim ( • )
EUROPA		Dinamarca Inglaterra	Diversas culturas • Diversas culturas
OCEANIA		Austrália	Mangueira • ; Espécies nativas

**Figura 3.** Algumas espécies vegetais hospedeiras do *L. theobromae* no Brasil e no mundo (Fonte: Tavares, 2003).



A disseminação deste fungo não é bem entendida, mas acredita-se que possa ocorrer pelo vento, água, sementes, insetos e pelo homem, via tratos culturais. Além, também, pelo uso de mudas e porta-enxertos contaminados, mas sem apresentar sintomas da infecção (Freire e Cardoso, 1997; Freire *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2006). Sua penetração nas plantas ocorre por aberturas naturais ou ferimentos (Cardoso *et al.*, 1998; Cysne, 2006).

A resinose é uma doença relativamente nova (Freire, 1991), mas bastante importante, em especial para o semi-árido nordestino, onde sua incidência tem crescido nos últimos anos. No início, foi julgada como uma doença de pouca importância, restrita a plantas velhas e estressadas. Contudo, hoje, já assume a principal posição em algumas regiões do semi-árido nordestino, onde já foi constatada sua ocorrência em níveis epidêmicos em pomares sob diversas condições de manejo e, indistintamente, em plantas estressadas e vigorosas. Esse avanço da resinose é resultado das condições climáticas favoráveis ao patógeno, já citadas e, principalmente, da predominância do cultivo do clone de cajueiro anão suscetível – CCP 76 (Cardoso *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2002; Freire *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2006).

Os sintomas iniciais da resinose aparecem entre o primeiro e o segundo ano após o plantio e caracterizam-se pelo escurecimento, intumescimento e rachadura da casca, seguidos de intensa exsudação de goma. Sob a casca ocorre o escurecimento dos tecidos que se prolonga até a parte interna do lenho. Se a doença progride, sintomas de deficiência nutricional, murcha, queda de folhas e morte dos ramos são observados, podendo ocasionar o colapso total da planta (Freire *et al.*, 2002; Oliveira, 2002; Cardoso *et al.*, 2004). Na figura 4, estão exibidas algumas imagens de plantas de cajueiro anão apresentando sintomas da resinose.

As perdas devido à resinose são decorrentes da redução da produção da planta, pelo bloqueio do movimento da seiva e redução da fotossíntese, e da produção do pomar, pela morte das plantas em virtude do avanço dos sintomas (Freire *et al.*, 2002; Bezerra *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2004).



**Figura 4.** Plantas de cajueiro anão precoce exibindo sintomas da resinose: (A) Aspecto dos ramos apresentado sintomas típicos da doença no caule; (B) Detalhe de uma área do caule infectado – exibindo rachaduras, necrose e eliminando resina; e (C) planta em estágio mais avançado da doença, com um ramo inteiro morto.



Na tentativa de controle da resinose, sugere-se a retirada do cancro e poda dos ramos infectados, seguida de uma aplicação de uma pasta de ação fungicida à base de cobre. Entretanto, esta medida é efetiva somente quando a área lesionada ou o número de ramos são limitados (Melo, 2002). Dentre os fatores que dificultam o controle desta doença, pode-se destacar a existência de um grande número de hospedeiros do patógeno (Pereira *et al.*, 2006) e o comportamento endofítico do *L. theobromae* (Cardoso *et al.*, 2009). Isto demonstra a necessidade do uso de cajueiros resistentes à sua infecção para obtenção de um controle viável da doença. Nesse contexto, o clone BRS 226 foi descrito como resistente a resinose (Paiva *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2006). Sua utilização é vantajosa tanto por aumentar a diversidade genética dentre os materiais plantados, uma vez que o clone CCP 76 tem sido predominantemente utilizado em diversas regiões, quanto por, o mesmo, apresentar um bom desempenho produtivo. Mais recentemente, o clone Embrapa 51, também, foi recomendado como uma alternativa de resistência à resinose (Cardoso *et al.*, 2007).

Atualmente, diversos estudos têm sido desenvolvidos pela Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE) no intuito de elucidar aspectos epidemiológicos e de controle desta fitomoléstia, em especial, quanto à seleção de genótipos de cajueiro resistentes (Paiva *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2006; 2007). Também, alguns trabalhos pontuais buscaram compreender o efeito da resinose na fotossíntese (Bezerra *et al.*, 2003) e o efeito das combinações de clones de cajueiro anão usados como enxerto e porta-enxerto na incidência desta doença (Cardoso *et al.*, 2010). Assim, pode-se constatar a inexistência de estudos sobre as respostas bioquímicas de defesa do cajueiro frente ao ataque do *L. theobromae*.

### ***1.3. Defesa das plantas***

Em seu ambiente natural, as plantas são constantemente desafiadas por uma grande variedade de inimigos potenciais, incluindo vírus, bactérias, fungos, nematóides, insetos e animais herbívoros. Patógeno vegetal pode ser definido como um organismo que, para completar uma parte ou todo o seu ciclo de vida, cresce dentro da planta e, ao fazer isto, traz efeitos deletérios para a mesma (Hammond-Kosack e Jones, 2000).

De maneira geral, os patógenos vegetais podem ser agrupados em 3 categorias, de acordo com sua estratégia de utilização dos tecidos vegetais como substrato: biotróficos, necrotróficos e hemibiotróficos. Os patógenos biotróficos penetram ou estabelecem um

contato com as células do hospedeiro, crescem e se reproduzem, nutrindo-se do tecido vegetal vivo. Os necrotróficos dependem do tecido morto do hospedeiro para sua nutrição, crescimento e reprodução. Já os hemibiotróficos, inicialmente, infectam as células vegetais vivas (fase biotrófica), mas, podem se desenvolver e reproduzir no tecido do hospedeiro morto (fase necrotrófica) (Hammond-Kosack e Jones, 2000; Grazebrook, 2005).

Os vegetais são capazes de reconhecer e responder a estímulos produzidos por um patógeno invasor e, ao longo de milhões de anos, tem desenvolvido defesas contra esses ataques. As plantas apresentando sistemas de defesa eficientes tendem a deixar progênie maior do que aquelas que apresentam menor proteção. Desse modo, a capacidade de produzir compostos de defesa efetivos tem se tornado amplamente estabelecido no reino vegetal. Contudo, muitas plantas cultivadas têm sido artificialmente selecionadas para produzir níveis mais baixos desses compostos protetores, uma vez que os mesmos são, muitas vezes, indesejáveis, como alimento, para o homem. Com isso, as plantas tornam-se mais vulneráveis aos seus inimigos (Hammond-Kosack e Jones, 2000).

Molecularmente, reações de defesa dependem da expressão e combinação de uma série específica de genes dominantes (*R*) em plantas e uma série correspondente de genes dominantes avirulentos (*Avr*) no patógeno (Keen, 1990). Essa estratégia de resistência gene-a-gene fundamenta a base molecular do sistema de defesa vegetal. Ela foi originalmente proposta por Flor (1955) e, de acordo com ela, se uma planta possui gene de resistência (*R*) dominante correspondente ao gene de avirulência (*Avr*) dominante do patógeno, a interação é dita incompatível e a doença não se desenvolve. Por outro lado, se não há correspondência entre os genes, a interação é compatível e a infecção progride (Hammerschmidt, 1999). Numa determinada interação planta-patógeno, mais de uma combinação específica de genes *R* e *Avr* estão, freqüentemente, envolvidas e isto reflete a complexidade dos mecanismos de defesa.

Durante o curso de sua co-evolução, plantas e patógenos vêm desenvolvendo uma relação intrínseca, resultado de uma contínua troca de informações moleculares. Patógenos têm desenvolvido uma série de estratégias para se alimentar e infectar plantas e, por sua vez, plantas têm desenvolvido diversos mecanismos de defesa, incluindo eventos constitutivos e induzidos (Zhao *et al.*, 2005).

Mecanismos de defesa constitutivos ou pré-existentes existem na ausência de agentes agressores e tornam as plantas imunes (não-hospedeiras) à maioria dos patógenos. São exemplos desta linha de defesa: barreiras estruturais, tais como ceras, cutina, calose, lignina e



compostos antimicrobianos pré-formados, como fenóis, taninos e alcalóides que previnem a colonização do tecido. Plantas, também, possuem respostas de defesa ativa que podem ser induzidas por todas as classes de patógenos vegetais e envolvem eventos como explosão oxidativa, morte celular rápida e localizada (resposta hipersensitiva), acúmulo de metabólitos secundários, reforço da parede celular e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) (Keen, 1999; Ferreira *et al.*, 2007).

A resposta hipersensitiva (HR) é caracterizada pela morte de células e tecidos localizados no sítio de infecção (Van Loon, 1997). Como resultado, o patógeno permanece confinado na região necrótica próxima ao local de invasão (Fritig *et al.*, 1998). Diversos eventos bioquímicos caracterizam esta resposta: perda de íons potássio e entrada de íons hidrogênio nas células, produção de fitoalexinas, aumento rápido e transitório de espécies reativas de oxigênio, indução de enzimas hidrolíticas e de proteínas-RP e a deposição de lignina e calose na parede célula vegetal (Stintzi *et al.*, 1993; Margis-Pinheiro *et al.*, 1999). Para patógenos biotróficos, a ocorrência da HR priva o patógeno de se alimentar dos nutrientes da planta e leva-os à morte. Porém, em interações envolvendo patógenos necrotróficos, o papel deste evento metabólico não é claro, uma vez que estes organismos se nutrem de tecidos mortos. Esse tipo de patógeno, paradoxalmente, se aproveita das reações de defesa da planta para exercer sua patogenicidade (Govrin e Levine, 2000; Mayer *et al.*, 2001).

O excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânions superóxido ( $O_2^-$ ) e radicais hidroxilas (-OH), é um importante mecanismo de defesa vegetal (Inzé e Montagu, 1995). Quando atacadas por patógenos, plantas ativam uma série de mecanismos que inclui o rápido acúmulo dessas espécies. ROS podem funcionar na defesa vegetal por ação tóxica direta contra o patógeno, induzir a formação de lignina, desencadear a produção de fitoalexinas e a reação hipersensitiva, o que restringe o desenvolvimento do patógeno (Peng e Kué, 1992; Vanacker *et al.*, 2000; Hammerschmidt, 2005). Por outro lado, quando em excesso, as ROS podem resultar em oxidação de proteínas, ácidos graxos insaturados e DNA, causando graves danos celulares e eventual morte da célula. Para isso, as plantas têm envolvido eficientes sistemas antioxidantes para eliminar e regular a gênese das ROS. Esses sistemas podem ser tanto não-enzimáticos – ascorbato, caretonéoides e compostos fenólicos – como os enzimáticos. Participando destes últimos, podemos citar as enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX).



As dismutase do superóxido (E.C 1.15.1.1; SOD) fazem parte de uma família de metaloenzimas que catalisam a conversão do ânion superóxido a oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo consideradas a primeira linha de defesa antioxidativa enzimática, ao proteger as células contra os efeitos deletérios dos radicais superóxidos. Estas enzimas estão presentes como diferentes isoformas e em diversos compartimentos celulares (Peixoto et al., 1999; Scandalios, 2005). É bem relatado que maior expressão da SOD promove proteção às células vegetais, tanto em situações de estresses abióticos, como seca, salinidade e alta luminosidade (Prashanth et al., 2008; Silva et al., 2010), quanto em estresses bióticos (Cavalcanti et al., 2006). Banerjee et al. (2010) demonstrou que plantas de tabaco transgênicas expressando uma proteína com atividade SOD (*SOD-active OsGLP1*) demonstraram tolerância à infecção causada pelo *Fusarium solani* e ao tratamento com um agente oxidante (persulfato de amônio). Essa proteção teria sido causada por grande acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e reforço da parede celular.

As catalases (E.C 1.11.1.6; CAT) são oxirredutases que convertem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio. As plantas possuem diversas isoformas desta enzima e são encontradas em glioxissomos e, principalmente, peroxissomos. Elas representam a principal linha de detoxificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Resende et al., 2003; Ribeiro et al., 2005), são bastante sensíveis a fotoinativação e podem ser inibidas por elevadas concentrações de peróxido de hidrogênio e de ácido salicílico (Foyer et al., 1994; Wendehenne et al., 1998). Em estudos de interação planta-patógeno, alterações no seu padrão de expressão podem exercer papel importante na resistência à doenças (Clarke et al., 2002; Silva et al., 2010).

As peroxidases do ascorbato (E.C 1.11.1.11; APX), assim como as catalases, atuam na eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido em excesso sob condições de estresse. Contudo, esta enzima exerce sua atividade utilizando, especificamente, o ascorbato como agente redutor, o qual é regenerado através do ciclo glutationa-ascorbato (Nakano e Asada, 1981; Asada, 1992). Em plantas, elas estão presentes, pelo menos, em três isoformas, localizadas nos tilacóides, estroma e citosol (Amako et al., 1994). Para patógenos necrotróficos, o papel desta enzima, juntamente com a CAT, teria grande relevância, pois impediria o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diminuindo, assim, a morte celular vegetal e, conseqüentemente, desfavorecendo o estabelecimento do patógeno (Fernandes, 2004).

A fenilalanina amônia liase (E.C 4.3.1.5; PAL) é a enzima chave do metabolismo de fenilpropanóides, catalisando a formação do ácido trans-cinâmico, por meio da eliminação de



uma molécula de amônia do aminoácido fenilalanina. A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário vegetal e sua reação está inserida na rota do ácido chiquímico, que converte precursores da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos e em diversos compostos de defesa – fenilpropanóides simples, lignina, isoflavonas, taninos condensados, ácido salicílico, dentre outros (El-Shora, 2002; Wen *et al.*, 2005; Taiz e Zeiger, 2004). A atividade da PAL é aumentada em situações de infecção e vários trabalhos relacionam a indução dessa enzima com maior proteção vegetal (Yao e Tian, 2005; Wen *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2005).

Proteínas-RP podem ser definidas como proteínas ausentes ou presentes em pequenas quantidades em plantas saudáveis, mas capazes de acumular-se em largas quantidades após uma infecção (Datta e Muthukrishnan, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Estas proteínas estão agrupadas em 17 famílias e compartilham algumas características que as diferem das demais proteínas, tais como estabilidade em pH baixo, localização, predominantemente, extracelular, boa resistência à ação de proteases e estabilidade sob altas temperaturas (Stintzi *et al.*, 1993; Ferreira *et al.* 2007). Existem dois mecanismos de ação gerais que as proteínas-RP exercem na defesa vegetal. O primeiro é bloquear diretamente o desenvolvimento de patógenos por ações variadas e o segundo é liberar elicitores não específicos a partir dos patógenos, aumentando as defesas da planta rapidamente. Outra importante característica destas enzimas é seu acúmulo tanto no sítio de invasão, como em locais mais distantes, caracterizando a resistência sistêmica adquirida – SAR (*Systemic Acquired Resistance*). A indução destas proteínas é descrita como um dos principais eventos de defesa das plantas contra fungos fitopatogênicos, embora a função de muitas proteínas-RP ainda não seja clara (Van Loon, 1997; Hammerschmidt, 1999; Ferreira *et al.*, 2007).

As peroxidases (E.C 1.11.1.7; POX) são proteínas-RP que estão associadas com eventos fisiológicos como crescimento, formação celular, biossíntese de etileno e resposta a vários estresses (Matamoros *et al.*, 2003). Elas participam de processos ligados à parede celular, tais como oxidação de fenóis e lignificação de células vegetais hospedeiras durante as reações de defesa contra agentes patogênicos (Datta e Muthukrishnan, 1999). Limitados processos de infecção têm sido correlacionados com atividade peroxidásica (Iriti e Faoro, 2003; Baysal e Zeller, 2004; Baysal *et al.*, 2005; Yao e Tian, 2005).

As proteínas-RP  $\beta$ -1,3-glucanases (E.C 3.2.1.39; GLU) e quitinases (E.C 3.2.1.14; QUI) são enzimas líticas capazes de hidrolisar a quitina (um polímero de *N*-



acetilglucosamina) e os  $\beta$ -1,3-glucanos (polímeros de glucose unidos por ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), respectivamente. Elas estão amplamente distribuídas entre os vegetais, apresentam-se como diferentes isoformas e suas propriedades têm sido bastante descritas (Van Loon, 1997). Há evidências de que estas enzimas exerçam, no mínimo, duas funções no controle de doenças. Elas são capazes de catalisar a degradação de paredes celulares de fitopatógenos (em especial, fungos), compostas por  $\beta$ -1,3-glucanos e quitina, e de liberarem oligossacarídeos biologicamente ativos (elicitores), capazes de regular o estado de imunização da planta (Hahlbrock *et al.*, 1995). Diversos trabalhos correlacionam a expressão destas proteínas com maior resistência vegetal, seja pela verificação do acúmulo destas enzimas em cultivares resistentes sob infecção (Liang *et al.*, 2005; Shetty *et al.*, 2009), seja pela sua indução por meio de elicitores no intuito de proteger a planta contra futuros ataques (Baysal e Zeller, 2004; Cota *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2007) e seja pela superexpressão estas enzimas (com o uso de plantas transgênicas), a fim de tornar as espécies vegetais mais resistentes à infecções (Hong e Hwang, 2006; Dana *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2010). Como exemplo, podemos citar o trabalho de Sha *et al.*, (2009) onde foi demonstrado que plantas de arroz transformadas para expressar o gene da quitinase (cht42) do fungo *Trichoderma virens* exibiram redução de 62% do índice da doença *sheath blight* causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*.

Nesse contexto, uma compreensão detalhada dos eventos bioquímicos e moleculares envolvidos nas interações planta-patógeno é uma etapa fundamental para pesquisas futuras que visem manipular as defesas das plantas, tanto com o intuito de elicitar vias metabólicas específicas que levem a uma defesa vegetal efetiva, quanto para inserir genes de defesa em culturas de importância econômica. Para diversos patossistemas, esses fenômenos são ainda poucos compreendidos e sua elucidação representa uma importante tarefa da patologia vegetal.

#### ***1.4 Marcadores protéicos no estudo das interações planta – patógeno***

Biomarcadores podem ser definidos como componentes bioquímicos ou estruturais que, ao serem medidos e avaliados, indicam um determinado processo celular normal ou induzido. Dentre os componentes celulares com potencial de biomarcador, as proteínas recebem um interesse especial por estarem envolvidas diretamente nos principais eventos celulares. Estudos genômicos e de transcritos, embora apresentem grande importância para



compreensão do metabolismo celular, têm suas limitações, uma vez que nem sempre há correlação direta entre a presença de determinado gene ou do mRNA com a presença da proteína correspondente ativa. Além disso, um mesmo gene pode codificar para diversas proteínas, devido aos processamentos pós-transcricionais e pós-traducionais. Também, é sabido que uma determinada proteína pode estar envolvida em mais de um processo e, inversamente, diferentes proteínas podem executar funções semelhantes. Todos esses eventos demonstram como os estudos proteômicos são complexos, mas extremamente valiosos (Fields, 2001; Mehta *et al.*, 2008).

Proteoma é definido como o conjunto de todas as proteínas expressas pelo genoma sob específicas condições. E a proteômica, conjunto de metodologias utilizadas para caracterizar um proteoma, permite determinações qualitativas e quantitativas de grande número de proteínas envolvidas diretamente com metabolismo celular (Cao *et al.*, 2008; Elvira *et al.*, 2008).

Diferentes técnicas têm sido desenvolvidas para estudos proteômicos. Com relação à separação das proteínas, existem disponíveis tanto métodos dependentes de géis, como eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida (2D-PAGE) e DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*), quanto métodos independentes destes, como o MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell Culture*) e iTRAQ (*Isobaric tag for relative and absolute quantitation*) (Quirino *et al.* 2010). Adicionalmente, métodos de fracionamento protéico, como o uso de agentes precipitantes (ex. sulfato de amônio), separação por tamanho molecular (ex. diálise) ou isolamento de organelas, podem ser adicionados como uma etapa prévia à separação das proteínas, a fim de reduzir a complexidade das amostras biológicas.

A integração e evolução de diferentes técnicas analíticas e de bioinformática permitiram as diferentes aplicações da proteômica através da análise, gerenciamento e integração dos dados. Contudo, estes estudos são desafiadores devido à grande complexidade das amostras e às baixas concentrações de inúmeras proteínas de interesse, o que requer o uso de técnicas extremamente sensíveis. Através da proteômica é possível sequenciar peptídeos/proteínas, identificar isoformas e modificações pós-traducionais, estudar localização protéica, identificar marcadores biológicos, compreender vias de sinalização e regulação envolvendo proteínas, conhecer interações protéicas, além de outras informações



sobre os estados fisiológicos e patológicos de células e organismos (Rocha *et al.*, 2005; Chen e Harmon, 2006; Mehta *et al.*, 2008).

Dentre as diversas abordagens aplicáveis para análise proteômica, a separação de proteínas por meio da eletroforese bidimensional e subsequente identificação por espectrometria de massas combinada com ferramentas de bioinformática, vem sendo a estratégia mais empregada.

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) permite a separação, detecção e quantificação de grandes quantidades de proteínas simultaneamente presentes em determinadas amostras biológicas. Por esta técnica, as proteínas são separadas pelo seu ponto isoelétrico ( $pI$ ) na primeira dimensão –focalização isoelétrica (IEF) – e pela sua massa molecular na segunda dimensão (SDS-PAGE). Quando combinadas, estas duas etapas permitem a separação de milhares de proteínas, levando à construção de ricos mapas protéicos (Andrade, 2006). A 2D-PAGE, também, permite a estimativa dos níveis de expressão protéicos e a visualização de isoformas de proteínas, produtos de degradação e modificações pós-traducionais. Algumas limitações desta técnica são a falta de automação e a dificuldade em resolver proteínas de membrana e proteínas altamente hidrofóbicas ou alcalinas (Rocha *et al.*, 2005; Chen e Harmon, 2006).

A espectrometria de massas (MS), técnica analítica bastante versátil, abrangente e usada nas mais diferentes áreas, mede, com bastante rapidez e sensibilidade, a massa de moléculas, a partir da razão entre a massa e a carga das moléculas ionizadas ( $m/z$ ) (Dass, 2001; Cunha *et al.*, 2006). De modo geral, um espectrômetro é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector. Um grande avanço tecnológico que ocorreu nessa técnica foi a conjugação de analisadores em seqüência (MS/MS), o que permitiu a fragmentação dos peptídeos trípticos, possibilitando determinar sua seqüência de aminoácidos. Algumas vantagens do sequenciamento MS/MS é a rapidez, o baixo custo e grande sensibilidade. Dentre as desvantagens estão as dificuldades de interpretação dos espectros e de distinção entre os aminoácidos isobáricos (Cantú, 2007; Cunha *et al.*, 2006).

A associação de equipamentos mais modernos com o desenvolvimento de *softwares* para análise dos dados, permitiu correlacionar os resultados com a seqüência de proteínas depositadas em banco de dados. Diferentes estratégias podem ser utilizadas para isto, como: uso dos mapas de peptídeos (*peptide mass fingerprinting* – PMF), utilização dos dados gerados por MS/MS não processados (*MS/MS ion search*) e busca por homologia de seqüências (*Basic*



*Local Alignment Search Tool* – BLASTs) (Jucá , 2010). Para espécies com genomas não seqüenciados, a busca por MS/MS é mais apropriada. Dentre as ferramentas de busca que correlacionam os espectros de massas dos fragmentos dos peptídeos com as seqüências de aminoácidos ou de nucleotídeos depositadas em bancos de dados, podemos citar o 'Mascot', 'PeptideSearch' e o 'Sequest' (Steen e Mann, 2004; Cantú *et al.*, 2008)

Com relação aos vegetais, estudos proteômicos são de grande valia por revelar mecanismos de crescimento, desenvolvimento e interações com o ambiente das plantas. Contudo, estudos proteômicos de plantas ainda estão atrasados, comparados, por exemplo, com os dos microrganismos e humanos, apesar do grande progresso ocorrido nos últimos anos. Os principais desafios enfrentados nestes estudos com vegetais estão relacionados à determinação de uma metodologia adequada para extração das proteínas nos diferentes tecidos e à identificação destas, especialmente, em 'plantas não-modelos' (Carpentier *et al.*; 2008; Mehta *et al.*, 2008; Quirino *et al.*, 2010).

Quanto à extração protéica de tecidos vegetais, as dificuldades estão relacionadas à baixa concentração de proteínas solúveis nos diversos tecidos; à grande presença de moléculas não protéicas (carboidratos, lipídeos e compostos fenólicos, dentre outras) que são co-extraídas com as proteínas e interferem nas técnicas proteômicas; à presença abundante de proteases, capazes de degradar proteínas de interesse; e à elevada concentração de determinados tipos de proteínas em certos tecidos, como por exemplo, rubisco nas folhas e proteínas de reserva em sementes (Carpentier *et al.*, 2005). Por isso, vários estudos têm sido conduzidos a fim de estabelecer protocolos eficazes de preparação de amostra para variados tecidos e espécies de plantas (Carpentier *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Sarma *et al.*, 2008; Sheoran *et al.*, 2009). Com relação ao problema de identificação das proteínas, a limitação reside na falta de banco de dados robustos com seqüências gênicas (ou de ESTs – *Expressed Sequence Tags*) e protéicas depositadas para 'espécies não-modelos'. Somente, algumas espécies vegetais, referidas como 'espécies modelos' (ex., *Arabidopsis thaliana*) ou de grande interesse econômico (ex., *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa* e *Vitis vinifera*), possuem essas informações disponíveis em bancos de dados públicos.

Estudos proteômicos focando a interação entre plantas e patógenos são escassos e têm sido realizados somente nos últimos anos. Dentre as razões para este despertar mais tardio, podemos citar as possíveis variações biológicas dos experimentos e a complexidade de se tentar compreender a dinâmica de proteínas de dois organismos interagindo de maneira íntima



(Quirino *et al.*, 2010). Estes tipos de estudos se tornam mais interessantes quando se pretende realizar análises comparativas entre amostras semelhantes em diferentes condições, como, por exemplo, a comparação entre amostras sadias e doentes de um mesmo tecido vegetal, assim como a comparação de diferentes cultivares de comportamento contrastante (suscetível e resistente) a um determinado patógeno, objetivando encontrar proteínas diferencialmente expressas.

Em tais estudos, a combinação da 2D-PAGE com a MS têm sido a abordagem mais utilizada e as proteínas vegetais identificadas variam, em especial, de acordo com o tipo de patógeno em questão. No caso de infecções por fungos, proteínas envolvidas com variados processos biológicos já foram detectadas: relacionadas à estresses e defesa, envolvidas com transdução de sinais e fotossíntese e, também, proteínas do metabolismo basal (Mehta *et al.*, 2008).

Análise proteômica comparativa de respostas de linhagem de milho suscetível e resistente à infecção pelo fungo *Curvularia lunata* demonstrou que houve superexpressão em folhas de uma proteína induzida por seca de 22 kDa, uma glutatona peroxidase e um fator de iniciação de tradução. Os autores sugerem que a presença de proteínas relacionadas a estresse oxidativo e proteínas induzíveis por seca podem contribuir para a resistência do milho ao *C. lunata* (Huang *et al.*, 2009). Cantú *et al.* (2008) estudando plantas cítricas afetadas pela morte súbita dos citros observou que dois diferentes conjuntos de proteínas do caule foram sensivelmente sub-expressos em plantas doentes, enquanto não foram, significativamente, alterados em plantas sadias e tolerantes. Um grupo foi identificado como quitinases e o outro como proteínas similares a miraculina (potencial inibidor de tripsina). Uma vez que já é bem sabido o papel das quitinases e dos inibidores de proteases como moléculas de proteção vegetal, estas proteínas podem ser utilizadas como potenciais marcadores negativos de citros afetados pela doença, neste patossistema. Como um último exemplo de interação planta-patógeno investigada com técnicas proteômicas, podemos citar o trabalho de Mukherjee *et al.* (2010) no qual avaliou a interação incompatível entre *A. thaliana* e o fungo necrotrófico *Alternaria brassicicola* e observou que, pelo menos, 11 proteínas da folha tiveram sua expressão alterada, para mais ou para menos, na condição infectada. Dentre as superexpressas, podemos citar: uma proteína-RP da classe 4, uma osmotina, uma glucanase, diversas glutatona-S-transferases (GST) e uma proteína semelhante à lectina. Quanto às sub-expressas, foram identificadas uma subunidade de proteassoma, NADPH-desidrogenase, uma



mirosinase, além de outras. Algumas das proteínas aumentadas têm papel reconhecido na proteção de plantas (glucanase, osmotina, PR-4, GST), porém várias outras não possuem relação óbvia com respostas de defesa (fosfoenolpiruvato carboxiquinase, ATP sintase, DBSA-oxidoreductase).

Os exemplos descritos acima demonstram a complexidade das respostas celulares durante as interações entre plantas e patógenos. Além disso, informações obtidas a partir de um determinado patossistema não aplicáveis para os demais. Por isso, estudos que busquem conhecer proteínas que regulem a resistência das plantas aos estresses são necessários para facilitar manipulações biotecnológicas que visem aumentar a qualidade dos alimentos e a produtividade vegetal.

---

**HIPÓTESE E  
OBJETIVO GERAL**



## **2.1 Hipótese**

A resistência do clone de cajueiro anão precoce BRS 226 à doença causada pelo fitopatógeno *L. theobromae* – a resinose – está correlacionada, em parte, às alterações no padrão de expressão de proteínas e outros metabólitos envolvidos com defesa vegetal no caule.

## **2.2 Objetivo geral**

Detectar diferenças bioquímicas, através da análise de proteínas e outros metabólitos, entre os clones de cajueiro anão precoce CCP 76 (suscetível à resinose) e BRS 226 (resistente à resinose).



**ANÁLISE COMPARATIVA DE METABÓLITOS  
LIGADOS À DEFESA VEGETAL ENTRE OS CLONES  
DE CAJUEIRO CCP 76 E BRS 226.**



## 1 Caracterização do problema e Justificativa

As interações entre plantas e patógenos representam uma verdadeira batalha entre dois organismos pela própria sobrevivência, na qual as plantas dispõem de uma ampla variedade de reações e moléculas de defesa a fim de sobrepor eficazmente a invasão dos seus inimigos e estes, por sua vez, desenvolvem constantemente novas estratégias para superar os mecanismos de resistência vegetal. Esta disputa tem sido um jogo evolucionário ao longo de milhões de anos e para cada inovação nas defesas do hospedeiro uma nova maneira para contorná-la foi desenvolvida pelo patógeno (Pascholatti e Leite, 1995; Keen *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2007).

Os mecanismos de resistência exibidos pelas plantas podem ser categorizados em constitutivos e induzidos ou, também, em físicos (barreiras estruturais) e químicos. As respostas constitutivas são inespecíficas e protegem a planta contra uma grande variedade de fitopatógenos. Já as respostas induzidas são específicas e extremamente eficazes, em interações incompatíveis (sem ocorrência da doença). Estas respostas são elicitadas por moléculas derivadas do patógeno e compreendem uma série de eventos metabólicos, como explosão oxidativa, morte celular programada, acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas á patogênese, além de outros metabólitos de defesa, reforço da parede celular e acúmulo de metabólitos secundários (Keen, 1999; Barbieri e Carvalho, 2001; Ferreira *et al.*, 2007).

A detecção de metabólitos produzidos pelos vegetais em situações de infecção é uma estratégia básica, mas extremamente importante para se compreender a dinâmica das reações de defesa das plantas e de ataque dos patógenos. Nesse contexto, diversas enzimas são classicamente analisadas em estudos de interação planta-patógeno pelas suas reconhecidas importâncias nos eventos relacionados à defesa vegetal. Dentre outras, podemos citar a superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase, no grupo das proteínas ligadas à proteção oxidativa; a peroxidase de fenóis e a fenilalanina amônia liase, como enzimas envolvidas no reforço da parede celular vegetal e na produção de metabólitos secundários de defesa; e a  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, como proteínas-RP genuinamente antifúngicas. Além destas enzimas, metabólitos como o peróxido de hidrogênio, fenóis e taninos, podem exercer papéis importantes na proteção das plantas.

No Brasil, a cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) destaca-se pela grande área cultivada e elevada produção de castanha, estando o Estado do Ceará no patamar de principal produtor nacional e exportador. Neste Estado, a cultura do cajueiro tem fundamental importância econômica e social, por constituir uma importante fonte de divisas aliada à grande absorção de mão-de-obra, no campo e na indústria (Oliveira, 2008). O cajueiro pode ser infectado por mais de 20 patógenos, sendo a maioria deles fungos. Estima-se que os prejuízos econômicos causados pelas doenças estão em torno de 40%. Destacam-se como as principais doenças de importância econômica a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*), o mofo-preto (*Pilgeriella anacardii*), a requeima (*Phytophthora hevea* e *P. nicotiana*), o tombamento das plântulas (*Pythium splendens*) e a resinose (Freire *et al.*, 2002; Melo, 2002).

Esta última é causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* e é uma doença pouco estudada devido sua recente detecção no Nordeste brasileiro e por ter sido julgada como uma doença de pouca importância, restrita a plantas velhas e estressadas (Freire, 1991; Cardoso *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2002). Atualmente, esta doença já assume posição de principal em algumas regiões do semi-árido nordestino em face da constatação da sua ocorrência em níveis epidêmicos em pomares (Cardoso *et al.*, 2007). Estudos realizados pela EMBRAPA Agroindústria Tropical (Ceará) apontaram o clone comercial de cajueiro anão precoce CCP 76 como altamente suscetível à resinose, além de identificarem o clone BRS 226 como sendo resistente à resinose (Paiva *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2006).

Diversas alterações bioquímicas ocorrem nos tecidos do cajueiro durante sua interação com o *L. theobromae*, o que se faz necessário uma análise minuciosa do tecido de infecção, o caule. Além disso, não há estudos bioquímicos sobre os mecanismos de defesa do cajueiro quando infectado por este patógeno. Por fim, conhecer quais substâncias e vias metabólicas participam dos mecanismos de defesa do cajueiro frente ao *L. theobromae* é uma condição básica para se desenvolver práticas agrícolas eficazes, oferecendo maior proteção da cultura ao fungo e reduzindo perdas econômicas e danos ambientais.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Geral**



Correlacionar a função de metabólitos reconhecidamente envolvidos com a defesa de plantas, com as características de suscetibilidade e resistência à resinose dos clones de cajueiro anão CCP 76 e BRS 226, respectivamente.

## **2.2 Específicos**

Estabelecer metodologias para extrair e quantificar proteínas solúveis do caule de cajueiro dos clones CCP 76 e BRS 226, sadio e infectado com *L. theobromae*.

Analisar a atividade das enzimas dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e catalase, relacionadas com o estresse oxidativo, no tecido do caule dos clones CCP 76 e BRS 226, sadio e infectado com *L. theobromae*.

Avaliar a atividade de enzimas peroxidase do guaiacol e fenilalanina amônia liase, envolvidas com metabolismo secundário vegetal e formação da lignina, no tecido do caule dos clones CCP 76 e BRS 226, sadio e infectado com *L. theobromae*.

Analisar a atividade de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, no tecido do caule dos clones CCP 76 e BRS 226, sadio e infectado com *L. theobromae*.

Extrair e quantificar os teores de peróxido de hidrogênio, fenóis totais e taninos no caule dos clones CCP 76 e BRS 226, sadio e infectado com *L. theobromae*.

Coletar ramos de cajueiro obtidos em fazendas do Piauí onde há severo aparecimento da resinose e quantificar, neste material, compostos (peróxido de hidrogênio, fenóis totais e taninos) e enzimas relacionadas à defesa (dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato, catalase, peroxidase do guaiacol, fenilalanina amônia liase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase).

## **3 Materiais**

### **3.1 Material biológico**

As mudas de cajueiro foram preparadas sob condições de viveiro na estação experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, Pacajus – CE. Os diferentes clones, CCP 76 e BRS 226, foram enxertados sobre o mesmo porta-enxerto, clone CCP 06. Noventa dias após a enxertia, as mudas foram trazidas para uma câmara de crescimento do Laboratório de

Proteínas Vegetais de Defesa do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da UFC, onde permaneceram sob fotoperíodo de 12 h (200-300  $\mu\text{E}/\text{mol}$ ), temperatura 25 – 30 °C e umidade relativa 40 – 80% (Figura 5).

Além das mudas, ramos de plantas adultas dos clones CCP 76 e BRS 226 sadios ou apresentando sintomas de infecção pelo *L. theobromae* foram coletados na Fazenda Planalto, pertencente à Companhia Industrial de Óleos do Nordeste (CIONE) localizada na BR 020, km 4, município de Pio IX, Estado do Piauí. As coordenadas geográficas da Fazenda são: Latitude de 6° 34' e 24,5'' S; Longitude de 40° 50' e 39'' W; Altitude de 730 m; temperatura média de 24 °C (18 – 36 °C) e a pluviosidade média de 609,7 mm. Nesta área, há grande incidência da resinose. Após a coleta, os ramos foram armazenados a -20 °C e trazidos para o laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do DBBM da UFC.

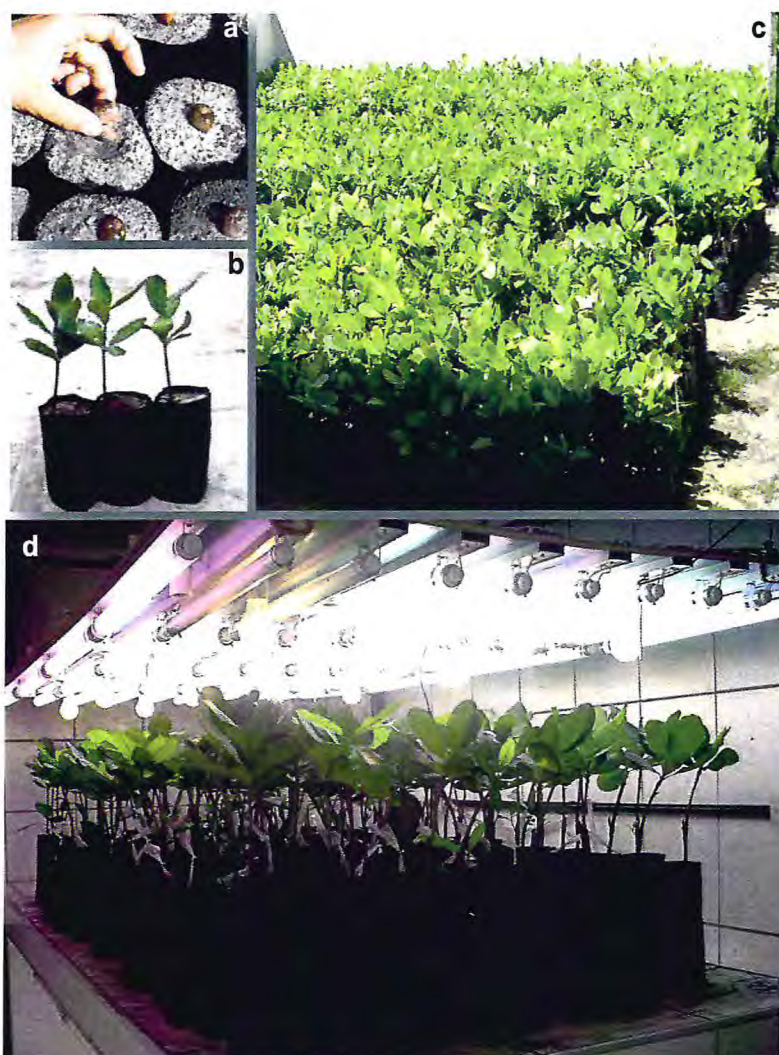
O fungo *L. theobromae* foi isolado do clone de cajueiro CCP 76 apresentando sintomas típicos da resinose. O microrganismo foi mantido em dois meios de culturas - aveia-água e batata-cenoura-água - uma vez que ambos estimulam sua esporulação.

### 3.2 Reagentes

Albumina sérica bovina (BSA), ácido ascórbico, azul brilhante de coomassie, *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), L-fenilalanina,  $\beta$ -Glucuronidase (obtida de *Helix pomatia*; tipo HP-2, 100.000 unidades/mL), guaiacol, laminarina (obtida de *Laminaria digitata*), *p*-nitro blue tetrazolium (NBT) e riboflavina foram obtidos da Sigma Co., St. Louis, USA.

Os demais reagentes utilizados foram obtidos comercialmente de diversas empresas e possuíam grau analítico.





**Figura 5.** Imagens ilustrando a produção de mudas; (a) Plantio da castanha para formação do porta-enxerto; (b) Aspecto das mudas aptas a serem enxertadas; (c) produção das mudas em viveiro. E, em (d) está exibido a manutenção das mudas em sala de crescimento sob condições controladas.

## 4 Metodologias

### 4.1 Inoculação das mudas de cajueiro

Nos experimentos onde houve infecção artificial das plantas com o patógeno, mudas sadias foram inoculadas aos 100 dias após enxertia (ou seja, 10 dias após aclimação das plantas) com uso de um dos métodos descritos a seguir:

Método da injeção - injeção de 50 uL de uma suspensão de  $10^5$  esporos/mL no caule das mudas cerca de 10 cm acima do solo com auxílio de uma seringa;

Método de bisel - deposição de um disco de 0,5 cm de diâmetro retirado de uma placa de meio de cultura contendo micélio e introduzidos em um corte feito no caule das mudas com auxílio de um bisturi (lâmina de 5 mm) cerca de 10 cm acima do solo.

Em ambos os métodos, após a aplicação do inóculo, um algodão umedecido com água destilada estéril foi posto em cima do ponto de inoculação e envolto com plástico tipo PVC para manter a umidade na região alta. Plantas controles foram inoculadas com injeção de água destilada estéril ou por deposição de um disco de meio de cultura (sem fungo) no caule. Após a inoculação, as plantas ficaram 12 h em ausência de luz e sob elevada umidade, cerca de 90%, para estimular o crescimento do fungo.

### 4.2 Experimento I – Avaliação bioquímica constitutiva dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226.

Este experimento foi elaborado a fim de responder a seguinte pergunta biológica: *será que existe diferença constitutiva entre os clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, com relação ao acúmulo de metabolitos relacionados à defesa de plantas?* Para isto, mudas de cajueiro aclimatadas por 10 dias (ou seja, 100 dias após enxertia) em sala de crescimento sob condições já descritas foram coletadas nos seguintes tempos: 100, 110, 120, 130, 140 e 150 dias após enxertia (DAE). Nestes tempos, os caules foram seccionados  $\pm 2$  cm acima e abaixo do ponto de inoculação, pesados e congelados a  $-83$  °C para posterior análise.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo a unidade experimental correspondente a 5 mudas de cajueiro. A análise de



variância foi realizada pelo programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

#### **4.3 Experimento II – Respostas bioquímicas imediatas dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, à infecção pelo *L. theobromae***

Este segundo experimento foi realizado com o objetivo de responder a seguinte questão biológica: *será que há uma rápida resposta bioquímica diferencial nos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, após a infecção artificial com o patógeno *L. theobromae*, com relação à ao acúmulo de metabolitos relacionados à defesa vegetal?* Para responder este questionamento, mudas de cajueiro aclimatadas por 10 dias em sala de crescimento sob condições já descritas foram coletadas nos seguintes tempos: 24, 48, 72 e 96 horas após inoculação (HAI). O método de inoculação utilizado neste experimento foi o método de bisel. Nestes tempos, os caules foram seccionados, avaliados quanto à incidência e severidade da resinose, pesados e congelados à -83 °C para posterior análise.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo a unidade experimental correspondeu a 6 mudas de cajueiro. A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

#### **4.4 Experimento III – Respostas bioquímicas tardias dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, à infecção pelo *L. theobromae***

Este experimento foi realizado com o objetivo de responder a seguinte questão biológica: *será que há uma resposta bioquímica tardia diferencial nos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, após à infecção artificial com o patógeno *L. theobromae*, com relação ao acúmulo de metabolitos relacionados à defesa vegetal?*

Para responder esta pergunta, mudas de cajueiro aclimatadas por 10 dias em sala de crescimento sob condições já descritas foram coletadas nos seguintes tempos: 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após inoculação (DAI). O método de inoculação utilizado neste experimento foi o método de injeção. Nestes tempos, os caules foram seccionados, avaliados quanto à incidência e severidade da resinose pesados e congelados à -83 °C para posterior análise.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições, sendo a unidade experimental correspondente a 5 mudas de cajueiro. A análise de variância foi realizada pelo programa estatístico SANEST e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

#### **4.5 Experimento IV – Análise bioquímica comparativa de ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadios e apresentando sintomas da resinose**

Este experimento foi realizado a fim de responder a seguinte pergunta biológica: *existe uma resposta bioquímica diferenciada em ramos de cajueiro adulto, clones CCP 76 e BRS 226, entre as condições sadio e exibindo sintomas típicos da resinose, com relação ao perfil de metabolitos ligados à defesa vegetal?*

Como descrito anteriormente, ramos de plantas adultas de cajueiro (cerca de 3 anos de idade) sadio e apresentando sintomas típicos da resinose foram coletados dos dois cajueiros alvos deste estudo: CCP 76 e BRS 226. A coleta se deu de forma aleatória em diferentes plantas e os dois clones de onde foram retirados os ramos encontravam-se em áreas de plantio bastante próximas, estando submetidos, assim, às mesmas condições ambientais e pressão do patógeno. Após a secção, os ramos foram congelados a -20 °C e trazidos para o Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa no DBBM da UFC, onde foram estocados a -83 °C para posterior processamento e análise.

#### ***4.6 Teste preliminar para obtenção do extrato enzimático***

Testes preliminares foram realizados para determinar qual o *melhor método* e qual o *melhor tampão* para a extração das proteínas do caule de cajueiro. Para isto, os caules de mudas do cajueiro CCP 76 com 100 dias após enxertia foram coletados e armazenados a -20 °C. Para cada teste, três repetições foram utilizadas, sendo cada repetição 1 planta.

Com relação á escolha do método de processamento do caule para posterior extrações de proteínas, procedeu-se como a seguir:

[1] Maceração manual do caule na presença do tampão em cadinho por 15 minutos em banho de gelo, seguida de filtração da suspensão em pano de trama fina, centrifugação (15.000 x g, 4 °C, 20 min) e coleta do sobrenadante;



[2] Liofilização do caule e pulverização em moinho para obtenção de um pó bastante fino. Contato do pó com o tampão de extração sob leve agitação a 4 °C por 1 h, seguido de centrifugação da suspensão (15.000 x g, 4 °C, 20 min) e coleta do sobrenadante para posterior análise.

Para os dois métodos analisados, o tampão utilizado foi o acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl. A relação massa (tecido):volume (tampão) utilizada foi 1:5 (m/v) para o método [1] e 1:15 (m/v) para o método [2]. O aumento do teor de proteínas nos extratos obtidos foi usado como parâmetro de avaliação da melhor metodologia de extração.

Após escolha do melhor método, pôde-se prosseguir com a escolha do tampão mais adequado para extração protéica dentre os seguintes:

[1] Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl;

[2] Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M;

[3] Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M;

[4] Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl e 3% de PEG;

Para a realização deste teste, foi utilizado somente o método [2] descrito acima. O desempenho dos métodos foi avaliado pela quantificação do teor de proteínas solúveis e de algumas enzimas de interesse deste trabalho - peroxidase do guaiacol, peroxidase do ascorbato e fenilalanina amônia liase (metodologias descritas a seguir, secção 4.9).

#### ***4.7 Processamento do material biológico***

Para a realização das análises bioquímicas, o material vegetal coletado (caules das mudas e ramos das plantas adultas) em todos os experimentos realizados foi liofilizado por, aproximadamente, 10 dias. Em seguida, os caules e ramos foram pulverizados em moinho até obter um pó bastante fino e armazenados a -20°.

#### ***4.8 Extração do peróxido de hidrogênio, fenóis solúveis e enzimas a partir do caule de cajueiro***

Para extração de peróxido de hidrogênio, o pó dos caules foi posto em contato com o tampão tetraborato de potássio 50 mM, pH 8,8, na proporção 1:30 (m/v), por 30 minutos, em

sonicador a 4 °C. Após o contato, a suspensão foi centrifugada (15.000 x g, 4 °C, 20 minutos;) e o sobrenadante, imediatamente, utilizado para análise.

Para extração de compostos fenólicos, o pó dos caules foi colocado em contato com uma solução de acetona 70%, na proporção 1:15 (m/v), por 30 minutos em sonicador a 4 °C. Após o período de contato, a suspensão foi centrifugada (15.000 x g, 4 °C, 20 minutos) e o sobrenadante armazenado a -20 °C.

Extratos protéicos foram preparados a partir do contato do pó com o tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl, 3% de PEG e 1% de PVPP, na proporção 1:15 (m/v), por 1 hora, sob leve agitação. Após o período de extração, a suspensão foi centrifugada (15.000 x g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante dialisado contra o tampão de extração sem o PEG, por 36 horas, a 4°C, para remoção de pigmentos e açúcares livres. Esta preparação foi estocada em freezer (-20°C) para análises posteriores.

#### **4.9 Análises bioquímicas**

##### *4.9.1 Teor de fenóis solúveis e taninos*

A dosagem de fenóis foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Makkar *et al.*, 1993). Este método é baseado nas reações de oxi-redução entre o reagente Folin e os compostos fenólicos formando um complexo de molibdênio e tungstênio de cor azul. A concentração de fenóis foi calculada com base em curva padrão feita com concentrações crescentes de ácido tânico (2,0 – 10,0 µg/mL). Para sua determinação-no caule de cajueiro, uma alíquota de 0,05 mL do extrato fenólico foi combinada com 0,45 mL de água, seguida da adição de 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu 1 N e 1,25 mL de carbonato de sódio 7,4%. A mistura reacional foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente ( $\pm$  25 °C) por 40 min, antes da leitura da absorbância a 725 nm (espectrofotômetro Novaspec III da Pharmacia). A quantificação dos fenóis foi expressa em miligrama de equivalentes de ácido tânico por grama de massa de tecido seca (mg AT/g MS).

O teor de taninos foi determinado pelo método de difusão radial (Hagerman, 1987). Por este método, os taninos difundem-se através de um meio contendo BSA e formam um precipitado no formato de anel, cujo diâmetro será considerado proporcional à sua concentração, que será calculada com base em uma curva padrão feita com concentrações



crescentes de ácido tânico. Para a quantificação de taninos no caule de cajueiro, volumes crescentes (0,01 – 0,06 mL) do extrato fenólico de cada amostra foram adicionados em poços feitos em placas de Petri contendo um meio composto por 1% de agarose, 0,1% de BSA e 60  $\mu$ M de ácido ascórbico, todos solubilizados em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2. Em seguida, as placas foram seladas e incubadas a  $\pm 30$  °C. Após 48 h, os diâmetros dos anéis, formados pela precipitação da BSA, foram medidos com auxílio de um paquímetro. A concentração de taninos foi calculada com base em curva padrão feita com concentrações crescentes de ácido tânico (0,1 – 0,6 mg/mL) e expressa em miligrama de equivalentes de ácido tânico por grama de massa de tecido seca (mg AT/g MS).

#### 4.8.2 Teor de peróxido de hidrogênio

A dosagem de peróxido foi realizada de acordo com a metodologia colorimétrica de Gay *et al.* (1999). A mistura reacional consistiu de 0,02 mL do extrato contendo peróxido de hidrogênio do cajueiro, 0,18 mL de tampão borax-borato 50 mM, pH 8,4, e 1,0 mL de solução de alaranjado de xilenol [100  $\mu$ L solução “A” (sulfato ferroso 25 mM, sulfato de amônio 25 mM e ácido sulfúrico 2.5 M) mais 10 mL da solução “B” (alaranjado de xilenol 125  $\mu$ M e sorbitol 100  $\mu$ M)] preparado no momento do ensaio. Esta mistura foi homogeneizada e incubada por 20 min à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C). As absorbâncias foram medidas a 560 nm (espectrofotômetro Novaspec III da Pharmacia), transformadas e expressas em  $\mu$ mol de peróxido de hidrogênio por grama de massa seca ( $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g MS).

#### 4.8.3 Teor de Proteínas solúveis

A determinação dos teores de proteínas foi feita seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 0,1 mL dos extratos totais. Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram feitas a 595 nm em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Albumina sérica bovina foi utilizada para obtenção de uma curva padrão e definição do fator de correção, necessário para determinar o teor de proteínas solúveis nos extratos.

#### 4.8.4 Determinações enzimáticas

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi de acordo com o protocolo descrito por Van Rossum *et al.* (1997) adaptado para ser feito em placas de micropoços tipo ELISA. O ensaio consistiu em medir a inibição da fotorredução do NBT pela enzima. A mistura reacional consistiu de 0,05 mL de extrato enzimático, 0,03 mL de água destilada, 0,01 mL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 7,8, 0,02 mL de EDTA 1 mM, 0,02 mL de Triton X-100 0,25%, 0,02 mL de L-metionina 130 mM, 0,02 mL de riboflavina 750  $\mu$ M e 0,020 mL de NBT 1 mM. Uma primeira leitura das microplacas foi realizada antes da exposição da mistura reacional à luz. Após, a reação foi iniciada pela exposição das placas a uma lâmpada fluorescente (32 W) e as absorbâncias analisadas por 5 min, em intervalos de 1 min, em leitora de ELISA (*Automated Microplate Reader*, modelo ELX800-Bio-Tex Instruments®, Inc) a um comprimento de onda de 630 nm. Foi feito um branco do ensaio onde foram colocados todos os reagentes, substituindo a amostra por água, no qual ocorreu a máxima redução do NBT. Uma unidade de atividade (UA) da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT e expressa como unidade de atividade por miligrama de proteína (UA/mg P).

A atividade da catalase (CAT) foi realizada baseada nos métodos descritos por Havir e McHale (1987) e Peixoto *et al.* (1999), com algumas modificações. 0,05 mL do extrato enzimático foi adicionado a 0,85 mL de tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,0, previamente incubado a 30 °C. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio 112,5 mM e, imediatamente, iniciada a medida do decréscimo da absorbância a 240 nm durante 2 min, em intervalos de 20 seg. A atividade da CAT foi estimada utilizando-se o coeficiente de absorptividade (extinção) molar de 36  $M^{-1} cm^{-1}$  (Anderson *et al.*, 1995) e expressa em  $\mu$ molar de  $H_2O_2$  consumido por segundo por miligrama de proteína.

O ensaio da peroxidase do ascorbato (APX) foi realizado segundo Koshiba (1993) e Peixoto *et al.* (1999), com algumas modificações. 0,1 mL do extrato enzimático foi adicionado a 0,8 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0 contendo 0,5 mM de ácido ascórbico e previamente incubado a 30 °C. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de uma solução de peróxido de hidrogênio 2 mM. O decréscimo da leitura de absorbância medido a 290 nm, durante 2 min, em intervalos de 20 seg, foi mensurado como índice de oxidação do ascorbato. A atividade APX foi determinada utilizando-se uma curva padrão de



concentrações conhecidas de ascorbato (0,1 – 1,0  $\mu\text{molAsc/mL}$ ) e expressa como nmol de ascorbato consumido por segundo por miligrama de proteína (nmolAsc/mg P).

Para determinação da atividade da peroxidase do guaiacol (POX), foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991). Guaiacol foi utilizado como substrato doador de prótons e peróxido de hidrogênio como receptor. A mistura reacional consistiu de alíquotas de 0,980 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 0,5 mL de guaiacol 0,02 M e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,06 M, incubados a 30 °C. Uma alíquota de 0,02 mL do extrato enzimático foi adicionada e, imediatamente, foram iniciadas as leituras de absorvâncias a 480 nm (espectrofotômetro Novaspec III da Pharmacia). O aumento da absorvância, devido a formação do composto 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona, foi acompanhado durante 2 min em intervalos de 20 segundos. A variação de 1,0 unidade de absorvância por minuto foi assumida como 1,0 unidade de atividade (UA) peroxidásica, sendo esta expressa em unidades de atividade por minuto por miligrama de proteína (UA/mg P).

A atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) foi determinada segundo método descrito por El-Shora (2002) e Mori *et al.* (2001) com algumas modificações. A mistura reacional consistiu de 0,1 mL do extrato enzimático, 0,2 mL de L-fenilalanina 0,04 M, 0,02 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05 M, 0,58 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8. Essa mistura foi incubada por 1 hora, a 30 °C. A reação foi parada pela adição de 0,1 mL de HCl 6 M. O ensaio consistiu na medida da quantidade de ácido trans-cinâmico produzido, a partir da desaminação da fenilalanina. Para isso, leituras de absorvância a 290 nm foram medidas, transformadas e expressas em nanomol de ácido trans-cinâmico produzido por hora por miligrama de proteína por hora (nmolAC/mg P). A atividade da PAL foi determinada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de ácido trans-cinâmico (0,01 – 0,1  $\mu\text{g}$  ácido trans-cinâmico/mL).

A atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU) foi determinada segundo o método descrito por Boller (1993) e medida em função da velocidade de formação de glucose a partir da degradação da laminarina, usada como substrato. A solução de laminarina (2,0 mg/L) foi dissolvida em água grau Milli-Q, aquecida a 60 °C, por 10 minutos e, em seguida, dialisada exaustivamente contra água grau Milli-Q para remoção da glucose livre. No ensaio, realizado em triplicata, 0,05 mL de extrato enzimático foi incubado com 0,05 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e 0,9 mL da solução de laminarina, a 50 °C, por 30 minutos. A seguir, 1,0 mL da solução "D" [1,0 mL da solução "B" [(15,0 g de sulfato de cobre pentahidratado,



0,02 mL de ácido sulfúrico concentrado e água grau Milli-Q q.s.p. 100 mL) mais 25 mL da solução “A” (25,0 g de carbonato de sódio anidro, 25,0 g de tartarato de sódio e potássio, 20,0 g de bicarbonato de sódio, 200,0 g de sulfato de sódio anidro e água grau Milli-Q q.s.p. 1000 mL)], preparada no momento do ensaio, foram adicionados e a mistura aquecida a 98 °C, em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em água corrente, por 5 minutos, 1,0 mL da solução “C” [3,0 g de arseniato de sódio e água grau Milli-Q, q.s.p. 25,0 mL] foi acrescido e, logo em seguida, os tubos agitados vigorosamente em vortex até a completa remoção dos gases formados na reação. Devido à formação de uma massa precipitada nos tubos de ensaio, uma centrifugação a 8.000 x rpm, por 10 min foi realizada. Leituras de absorbância em 520 nm foram feitas utilizando-se o sobrenadante e a quantidade de monômeros de glucose liberados foi determinada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de D-glucose, variando de 3 a 30 µg/mL. A atividade β-1,3-glucanásica foi expressa em nanokatal por miligrama de proteína (nkatGlu/mg P), onde 1,0 nkat equivale a 1,0 nmol de glucose liberado por segundo, nas condições do ensaio.

A atividade quitinásica (QUI) foi determinada combinando-se os métodos descritos por Reissig *et al.* (1955) e Boller (1993). O ensaio consistiu em medir o complexo colorido formado no meio reacional com *N*-acetil-D-glucosamina (NAG), liberada pela ação hidrolítica da enzima sobre a quitina coloidal utilizada como substrato e preparada como descrito por Martins-Miranda (2002). Para determinação da atividade quitinolítica total, 0,250 mL de extrato enzimático, previamente diluído 5 vezes com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,2) foi incubado com 0,25 mL de quitina coloidal (10 mg/mL), a 37 °C, sob constante agitação, por 1 hora. O ensaio foi feito em triplicata. Para os brancos das amostras, apenas as alíquotas dos extratos enzimáticos foram colocadas no tubo tipo “Eppendorff”, sem o substrato. Todos os tubos foram aquecidos a 98 °C, em banho maria, por 5 min e, logo em seguida, foram resfriados em água gelada. Neste momento, foi adicionado o substrato (0,25 mL de quitina coloidal) aos brancos das amostras. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 10 min, a 5 °C, e alíquotas de 0,3 mL do sobrenadante foram cuidadosamente retiradas e transferidas para um novo tubo tipo “Eppendorf”. As amostras foram, novamente, incubadas a 37 °C, por 1 h, sob constante agitação, com uma alíquota de 0,01 mL da solução da enzima glucuronidase, previamente diluída dez vezes com água grau Milli-Q. Após a reação, os tubos foram aquecidos a 98 °C, em banho-maria, por 5 min e resfriados em água gelada. Aos 0,31 mL dos hidrolisados foram adicionados 0,19 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 e



0,1 mL de tetraborato de potássio 0,6 M. A mistura reacional foi aquecida a 98 °C, precisamente, por 5 min e resfriadas antes da adição de 1,0 mL de uma solução DMAB (10,0 g de DMAB dissolvidos em ácido acético glacial contendo 12,5% de ácido clorídrico 11,5 M), diluída duas vezes com ácido acético glacial no momento do seu uso. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 20 min e, rapidamente, as leituras de absorbância foram realizadas a 585 nm. Concentrações crescentes de NAG (100 – 600 mM) foram utilizadas para obtenção da curva padrão e definição do fator de correção, necessário para calcular a quantidade de açúcar liberado na reação. A atividade quitinásica foi expressa em nanokatal por miligrama de proteína (nkatGlu/mg P), onde 1,0 nkat equivale a 1,0 nmol de NAG liberado por segundo, nas condições do ensaio.

## **5 Resultados**

### ***5.1 Testes preliminares e processamento da amostra***

Para iniciar um estudo que vise detectar proteínas de um determinado material biológico é importante a seleção de um método e solução (tampão) adequados para extraí-las. Por isso, um experimento preliminar de extração protéica foi realizado com o tecido de caule do cajueiro.

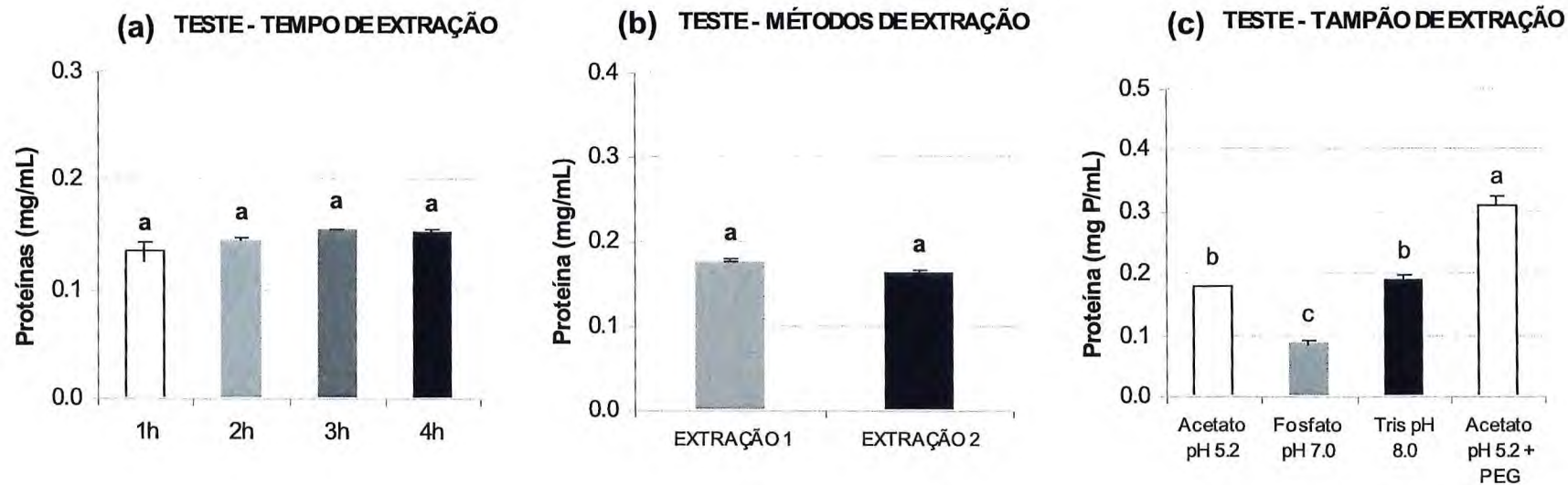
Com relação à escolha da metodologia de processamento do caule para extração protéica, foram avaliados dois métodos: (1) maceração manual do caule na presença do tampão e (2) liofilização do caule e pulverização em moinho para posterior contato com o tampão de extração sob agitação. Um mesmo tampão (acetato de sódio 50 mM, pH 5,2 contendo 0,15 M de NaCl) foi utilizado neste teste. A Figura 6a mostra que quase não houve diferença com relação ao conteúdo de proteínas extraídas através dos dois procedimentos. O primeiro é um método bastante comum, descrito em muitos trabalhos científicos. Contudo, não há uma padronização ótima da extração protéica, uma vez que se trata de um método completamente manual, diferentemente do segundo método. Por esta razão, o Método [2] foi escolhido para as demais etapas deste trabalho.

No teste anterior, o método escolhido (Método [2]) consistiu no contato do pó do caule de cajueiro com o tampão de extração por um período de 1 hora. Um novo teste foi realizado

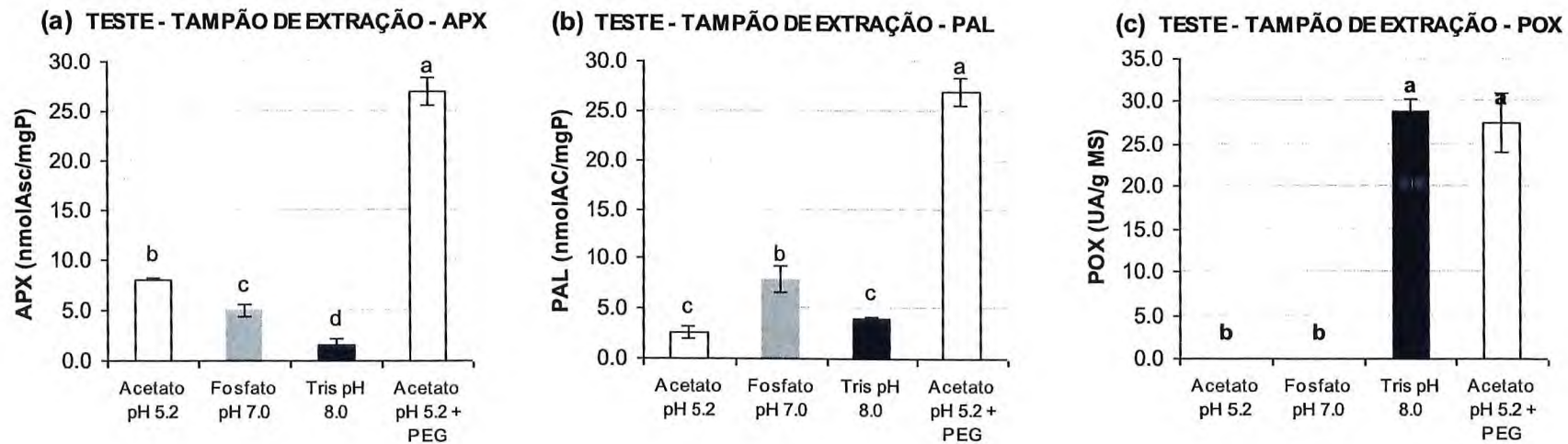
para confirmar se este tempo de contato estava sendo satisfatório. Para isto, foram testados quatro tempos de extração: 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. Um leve aumento, cerca de  $\pm 14\%$ , foi observado com o tempo de 3 h de extração em relação ao tempo de 1 h (Figura 6b). Os demais tempos, praticamente, não diferiram entre si. Com base nestes resultados, o tempo de 1 h de extração foi escolhido, a fim de abreviar o tempo gasto com a etapa de extração protéica e, assim, proteger o extrato protéico tanto da ação de proteases, que são co-extraídas e capazes de degradar as proteínas de interesse, quanto de possível contaminação com microrganismos.

Portanto, o método [2], com tempo de extração de 1 h foi definido para extrair as proteínas do caule de cajueiro. Com relação à extrações de proteínas solúveis (Figura 6c) e atividade das enzimas APX (Figura 7a), PAL (Figura 7b) e POX (Figura 7c), o tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2 contendo NaCl 0,15 M e PEG 3% foi bastante superior aos demais testados, exceto na dosagem da POX, já que não houve diferença importante entre o tampão acetato contendo o PEG e o tampão tris-HCl 100 mM pH 8,0, ambos, contendo NaCl 0,15 M. Entretanto, a notória diferença entre o tampão acetato com PEG e sem PEG, demonstrou a necessidade deste agente osmótico ser adicionado ao tampão para melhorar a capacidade de extração das proteínas e enzimas do caule do cajueiro.





**Figura 6.** Testes preliminares para determinação do melhor método (a), tempo (b) e tampão de extração de proteínas do caule de cajueiro anão precoce. Os métodos testados foram: Extração [1] Maceração manual do caule, na presença do tampão em cadinho, por 15 min em banho de gelo, seguido de filtração e centrifugação da suspensão. Extração [2] Liofilização e pulverização do caule, contato do pó com o tampão de extração por 1 h e centrifugação da suspensão. Os tempos de extração foram testado utilizando-se somente o método [2]. Os tampões analisados foram: [1] Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl; [2] Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M; [3] Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e [4] Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl e 3% de PEG. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 7.** Teste preliminar para determinação do melhor tampão de extração. As enzimas escolhidas para serem analisadas foram: peroxidase do ascorbato - APX (a), fenilalanina amônia liase – PAL (b) e peroxidase do guaiacol – POX (c). Os tampões testados foram: [1] Acetato de sódio 0,05, M pH 5,2, contendo 0,15 M, de NaCl; [2] Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M; [3] Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e [4] Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo 0,15 M de NaCl e 3% de PEG. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



## **5.2 Experimento I – Avaliação bioquímica constitutiva dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226.**

Neste experimento foi possível avaliar o perfil constitutivo de diversos compostos e enzimas relacionados à defesa vegetal nos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226.

Quanto ao conteúdo de fenóis solúveis nas amostras, houve uma sensível diminuição na quantidade de fenóis ao longo do tempo em ambos os clones (Figura 8). Entretanto, não houve grandes diferenças entre os dois clones estudados, exceto aos 110 DAE e 150 DAE, quando houve menor detecção (1,29 e 1,24 vezes menos, respectivamente) no clone resistente.

Com relação ao conteúdo de taninos (Figura 9), também, não houve diferenças entre os cajueiros CCP 76 e BRS 226, exceto aos 150 DAE que foi levemente maior (1,18 vezes) no clone CCP 76 e seu teor permaneceu relativamente constante ao longo do tempo nos diferentes clones.

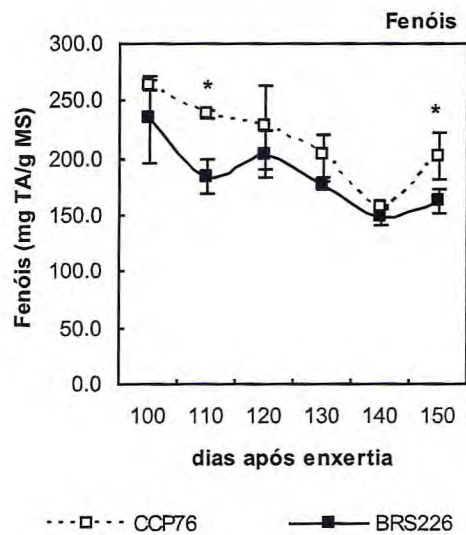
O teor de peróxido de hidrogênio foi semelhante em todos os tempos analisados entre os dois clones, exceto aos 150 DAE (Figura 10). Uma grande queda no conteúdo de  $H_2O_2$  em ambos os clones entre 110 DAE e 140 DAE. No final houve uma recuperação.

Em relação ao conteúdo de proteínas solúveis (Figura 11), a média dos dias examinados diferiu estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ), comparando os clones CCP 76 e BRS 226 somente nas coletas de 110 DAE e 140 DAE.

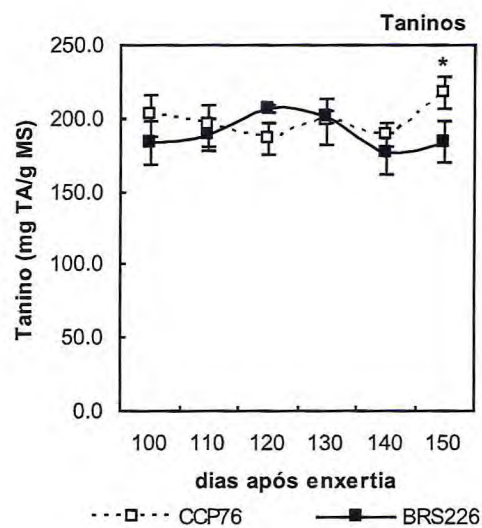
A atividade da SOD foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ) no clone suscetível em todos os tempos avaliados, exceto aos 140 DAE (Figura 12). Surpreendentemente, nenhuma atividade catalásica foi detectada nos dias examinados. Quanto à APX, esta se comportou igualmente em ambos os clones, não havendo diferenças nos dias examinados (Figura 13).

Valores consideravelmente maiores da POX (Figura 14) e PAL (Figura 15) foram observados no clone suscetível, CCP 76, em todos os tempos analisados, exceto aos 120 DAE para a primeira e aos 130 DAE para a segunda enzima.

Com relação à GLU, houve uma grande oscilação ao longo dos tempos estudados nos dois clones, porém em três tempos, 100, 120 e 150 DAE, seu teor foi maior, 30%, 74% e 73%, respectivamente, no clone resistente (Figura 16). E, por fim, a quitinase não diferiu entre os clones nos vários tempos analisados, exceto aos 140 DAE, que sua atividade foi 56% maior no suscetível (Figura 17).

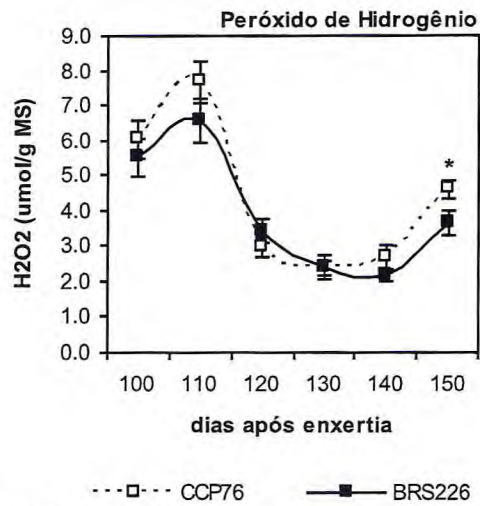


**Figura 8.** Teor constitutivo de fenóis solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

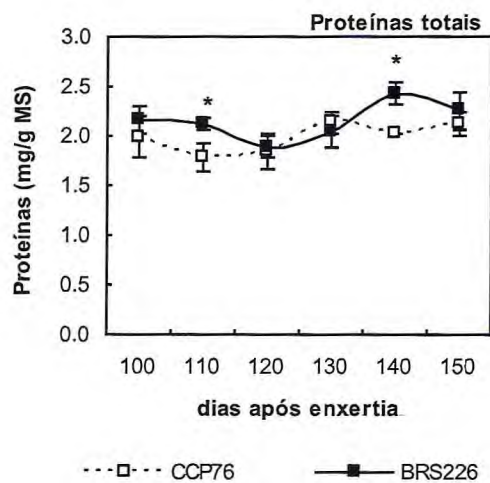


**Figura 9.** Teor constitutivo de taninos em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

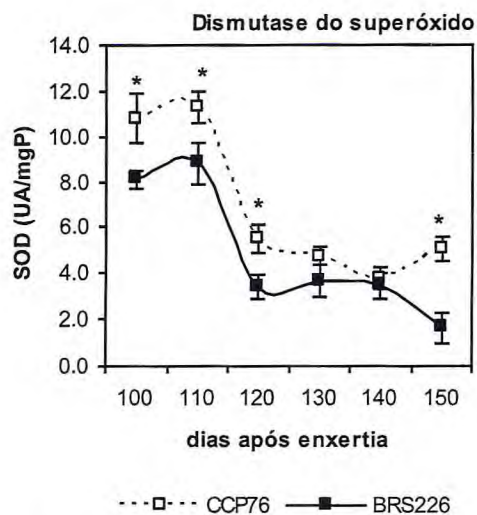




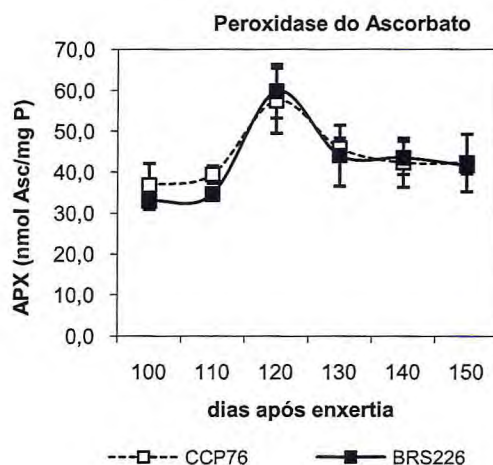
**Figura 10.** Teor constitutivo de peróxido de hidrogênio em caule de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 11.** Teor constitutivo de proteínas solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

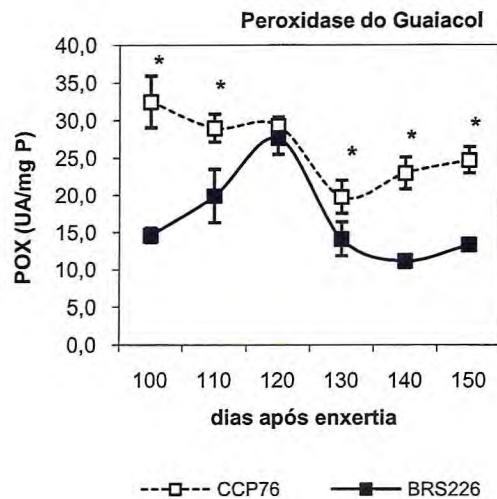


**Figura 12.** Atividade constitutiva da enzima dismutase do superóxido em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

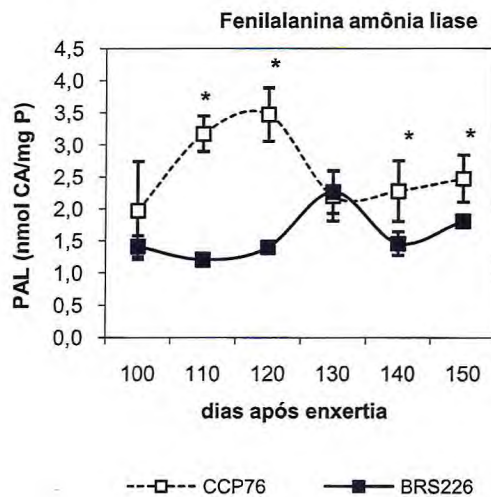


**Figura 13.** Atividade constitutiva da enzima peroxidase do ascorbato em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

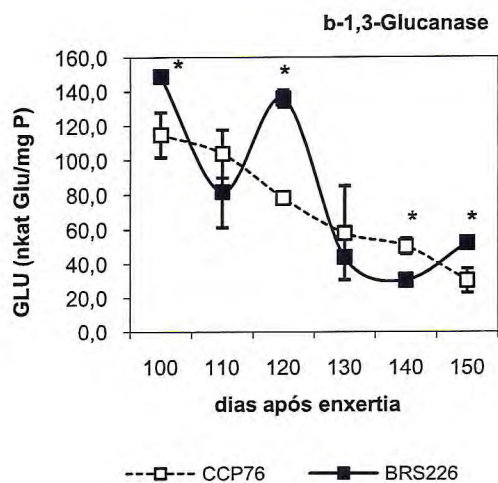




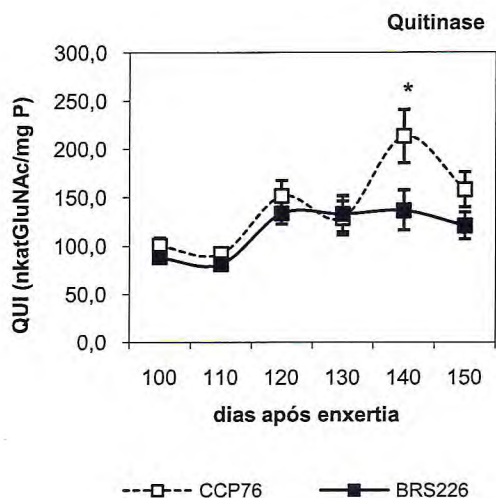
**Figura 14.** Atividade constitutiva da enzima peroxidase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 15.** Atividade constitutiva da enzima fenilalanina amônia liase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 16.** Atividade constitutiva da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 17.** Atividade constitutiva da enzima quitinase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após enxertia (DAE). Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



### **5.3 Experimento II – Respostas bioquímicas imediatas dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, à infecção pelo *L. theobromae***

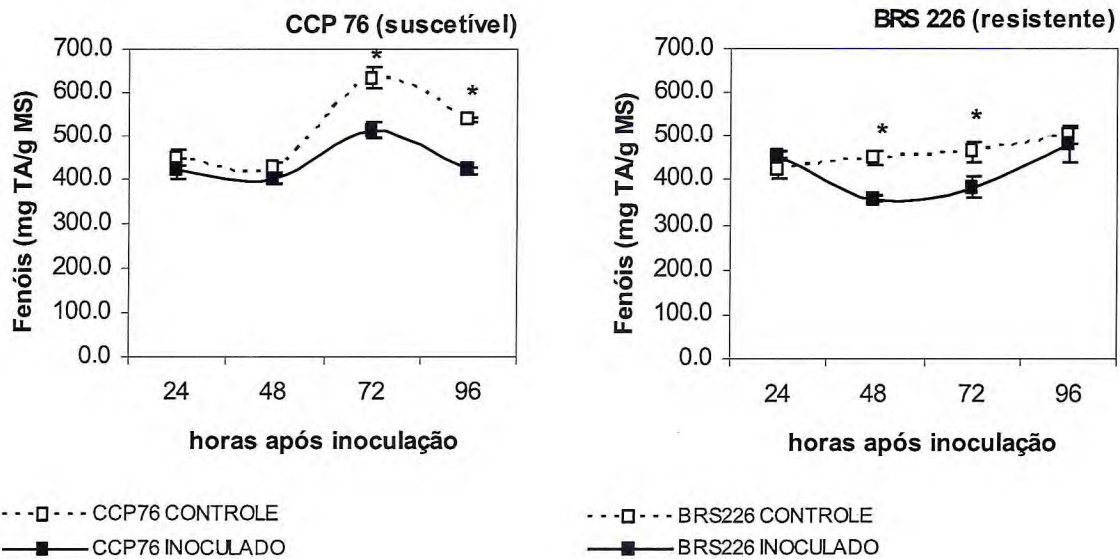
Este experimento foi elaborado na tentativa de se detectar possíveis respostas diferenciadas à infecção pelo *L. theobromae* entre os dois clones alvos deste estudo, em períodos recentes, imediatamente após a infecção artificial com este patógeno.

Quanto à análise da incidência e severidade da resinose, não foi possível observar diferenças entre os caules inoculados e não inoculados com o *L. theobromae*, em nenhum dos dois clones de cajueiro alvos deste estudo ao longo dos vários dias analisados. Porém, para que se pudesse confirmar a presença do patógeno no caule, um re-isolamento do fungo foi feito em meios de cultura (meio agar e meio batata-dextrose-água) a partir de pedaços do caules de ambos os clones inoculados artificialmente no experimento. E, então, pôde-se confirmar a presença do patógeno no tecido de infecção, através da análise do crescimento da colônia, que se apresentava de maneira típica, e dos esporos que, também, foram observados de maneira característica.

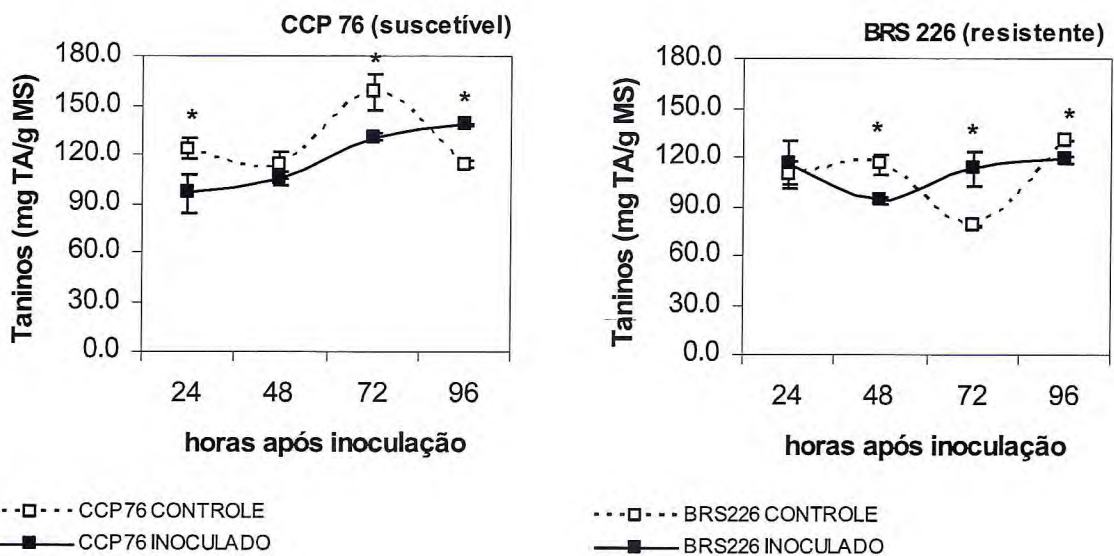
Quanto ao teor de fenóis solúveis (Figura 18), de modo geral, seu acúmulo foi maior nos grupos controles de ambos os clones. Sendo que, no clone suscetível estes teores alcançaram valores mais elevados, cerca de 11% acima, em média, comparados com o resistente. O acúmulo de taninos (Figura 19) oscilou bastante ao longo dos tempos examinados, nos dois clones, não sendo possível concluir alguma tendência de resposta à infecção. Contudo, comparando os diferentes clones, os teores de taninos, no geral, foram maiores 14%, em média, no clone suscetível.

O teor de peróxido de hidrogênio (Figura 20) exibiu perfil bastante semelhante entre os grupos experimentais, controle e inoculado, nos dois clones. Contudo, houve maior acúmulo de peróxido (20%) no clone suscetível.

Com relação ao teor de proteínas (Figura 21), no clone suscetível, a presença do patógeno elevou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) o teor protéico. Já no clone resistente, houve oscilação ao longo dos tempos examinados, com 48 HAI, quando foi maior nas plantas inoculadas, e 72 h, quando maior teor foi detectado no grupo controle.

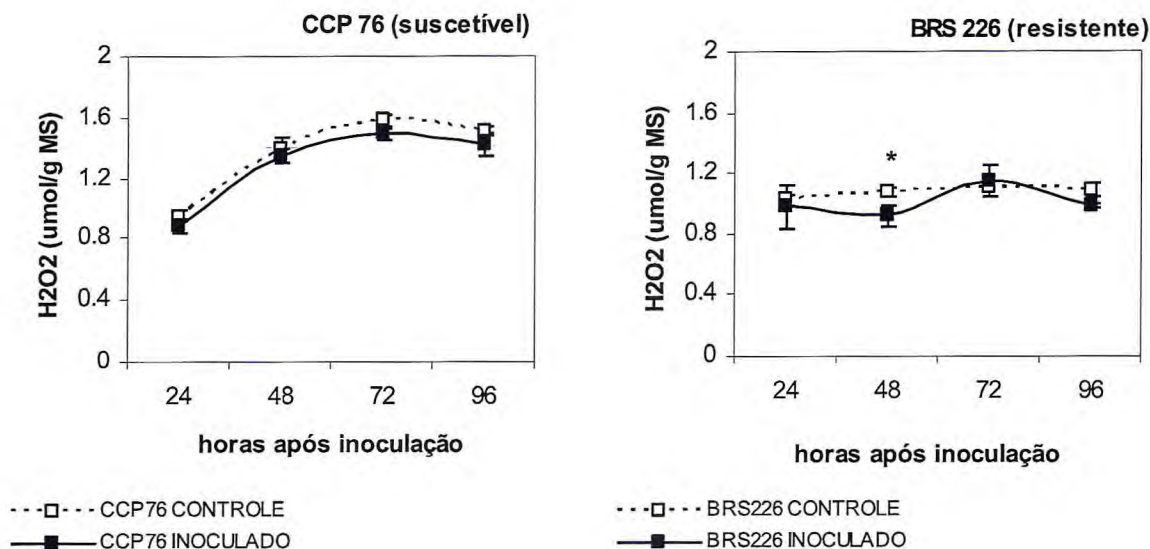


**Figura 18.** Teor de fenóis solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

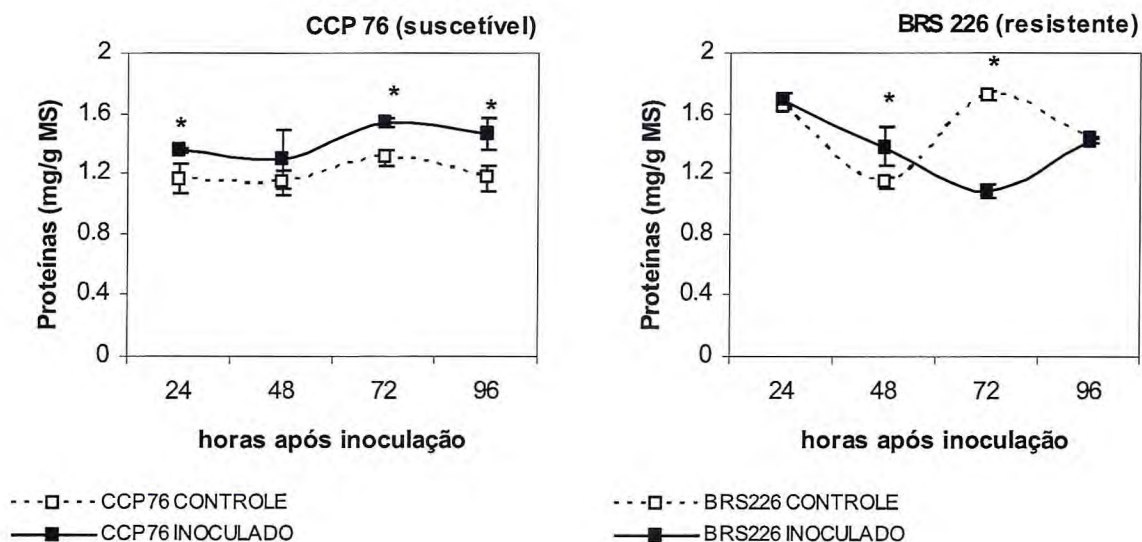


**Figura 19.** Teor de taninos em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.





**Figura 20.** Teor de peróxido de hidrogênio em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 21.** Teor de proteínas solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

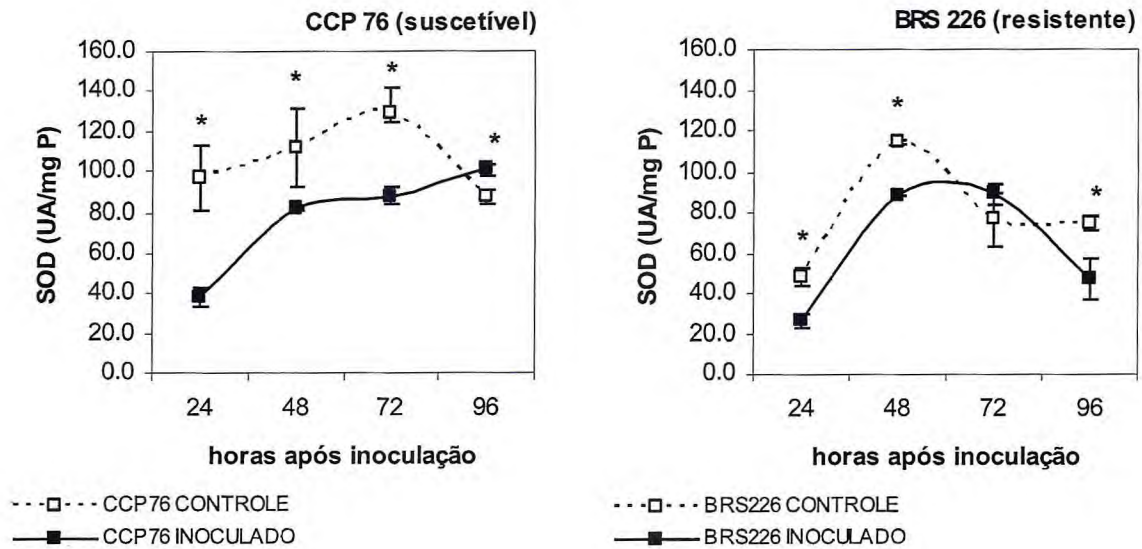
A atividade da SOD foi mais elevada nos grupos controles de ambos os clones e, em especial, no clone CCP 76, que exibiu os maiores níveis desta enzima (Figura 22) na maioria dos tempos analisados. Quanto à APX, no geral, não houve diferenças importantes entre os clones e entre as duas condições, controle e inoculada (Figura 23). Nenhuma atividade CAT foi detectada nas amostras, a exemplo do experimento anterior.

A atividade da POX (Figura 24) foi maior nos grupos controle de ambos os clones nos tempos examinados. Contudo, a diferença foi mais pronunciada 24 HAI e 48 HAI no CCP 76 (1,7 e 1,9 vezes mais, respectivamente) e 48 HAI e 96 HAI no BRS 226 (2,1 e 1,5 vezes mais, respectivamente). A PAL (Figura 25) foi extremamente baixa em todos os grupos experimentais e tempos avaliados, exceto no clone CCP 76, 24 HAI, quando foi detectada uma maior atividade, mas sem diferença significativa entre as condições controle e inoculada.

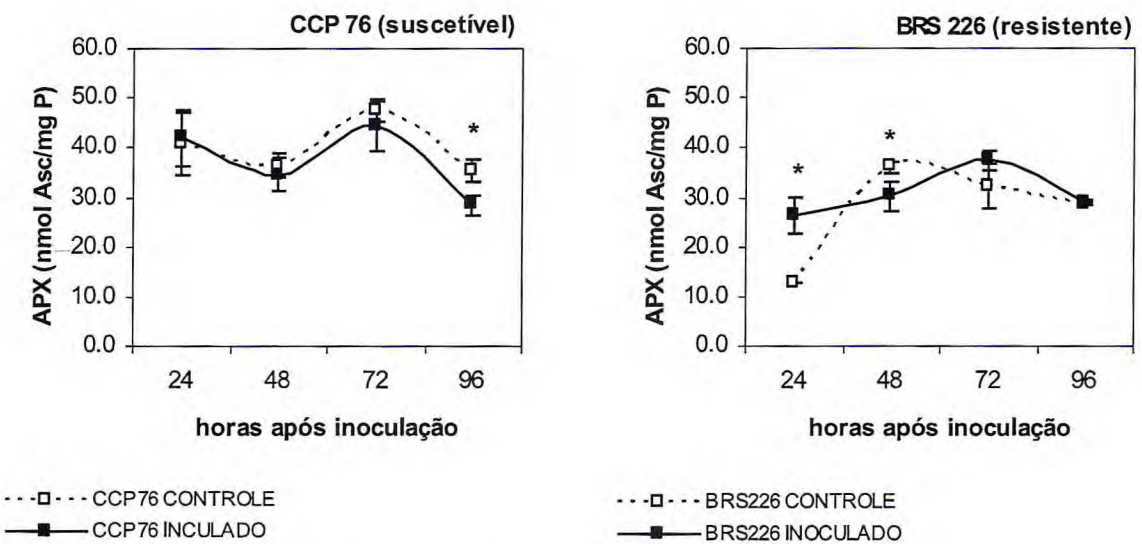
Com relação a GLU (Figura 26), a atividade foi significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior em alguns dos tempos analisados no grupo inoculado dos dois clones. No suscetível, as maiores atividades foram observadas 24 HAI e 48 HAI. No resistente, as maiores atividades foram observadas 48, 72 e 96 HAI. Além disso, no clone resistente, essa diferença atingiu valores mais altos (em média, 12% maiores) e permaneceu até o último dia de análise, diferentemente do clone suscetível no qual não foi detectada nenhuma diferença entre os grupos controle e inoculados no último dia de análise.

Por fim, quanto à QUI (Figura 27), a atividade no grupo infectado do clone CCP 76 foi maior (52%) do que no seu grupo controle, 72 HAI. Já no clone BRS 226, neste mesmo tempo, houve um alto pico de atividade enzimática no grupo inoculado (120% maior), comparando com seu grupo controle.

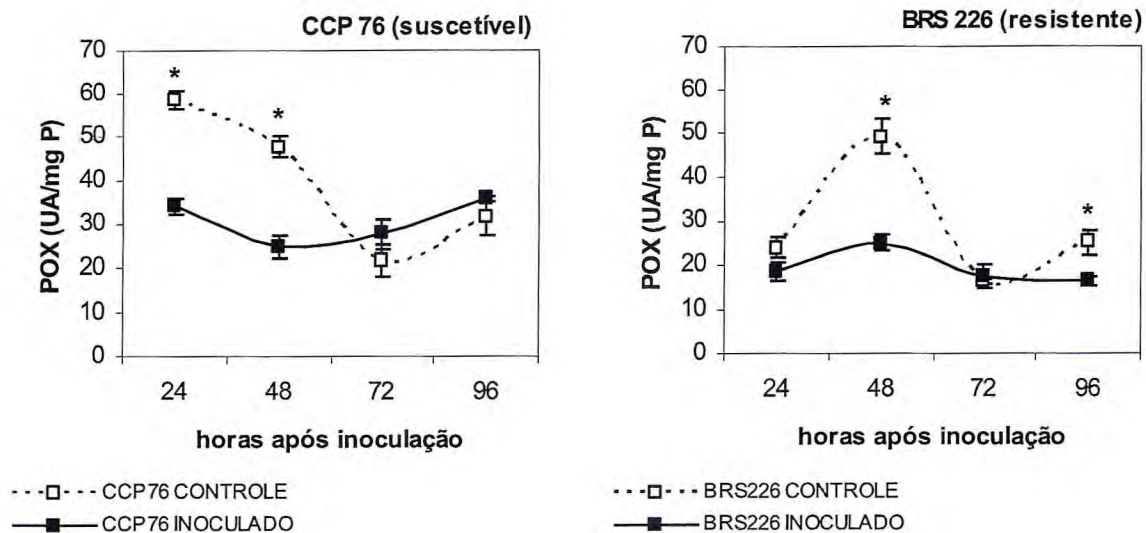




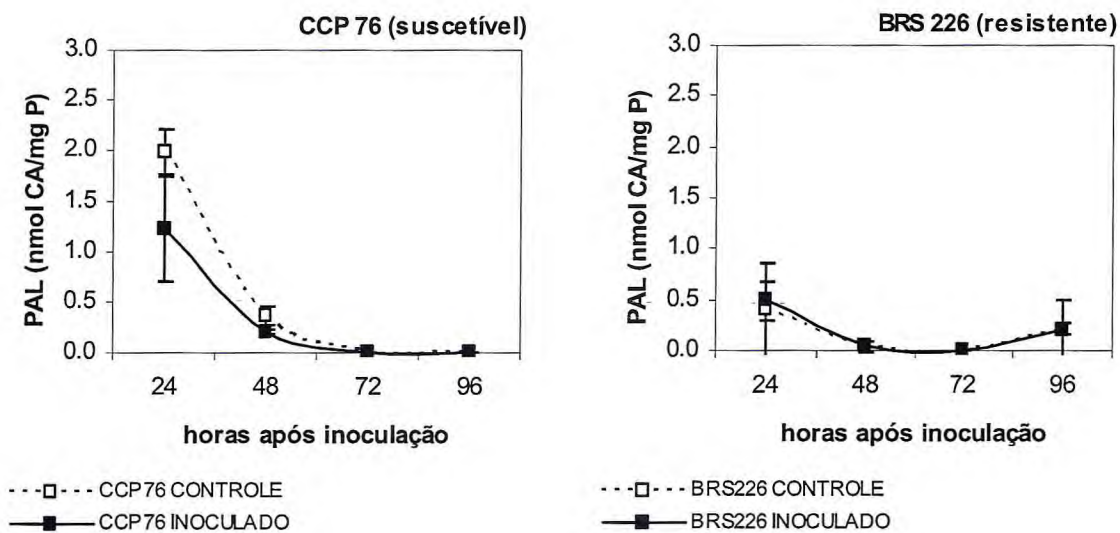
**Figura 22.** Atividade da enzima dismutase do superóxido em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 23.** Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

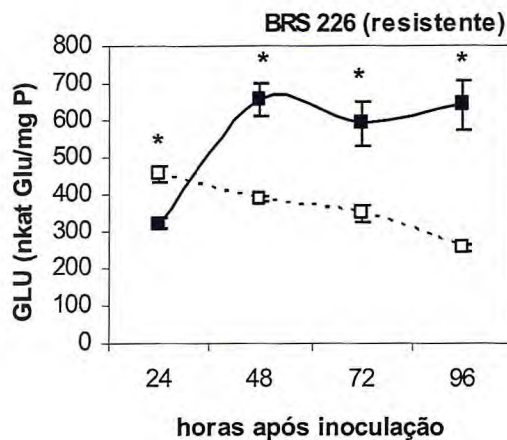
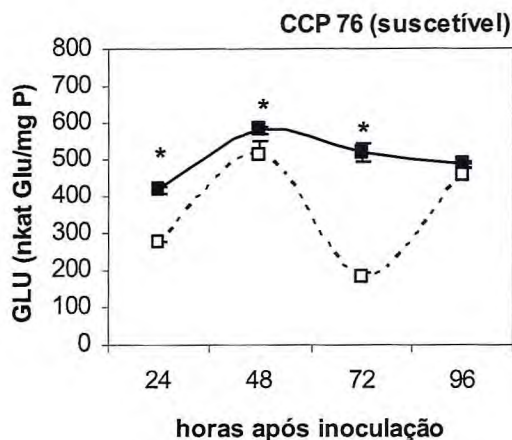


**Figura 24.** Atividade da enzima peroxidase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 25.** Atividade da enzima fenilalanina amônia liase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

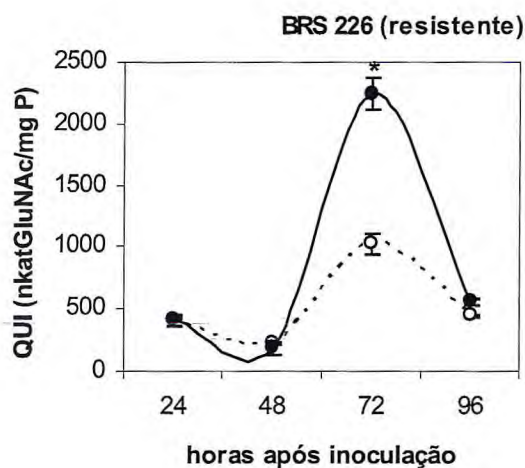
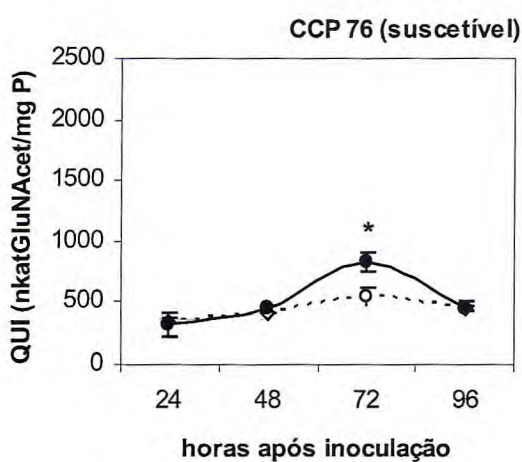




---□--- CCP76 CONTROLE  
 —■— CCP76 INOCULADO

---□--- BRS226 CONTROLE  
 —■— BRS226 INOCULADO

**Figura 26.** Atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



---◇--- CCP76 CONTROLE  
 —●— CCP76 INOCULADO

---○--- BRS226 CONTROLE  
 —●— BRS226 INOCULADO

**Figura 27.** Atividade da enzima quitinase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 (esquerda) e BRS 226 (direita), em diferentes horas após inoculação (HAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

#### **5.4 Experimento III – Respostas bioquímicas tardias dos clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, em resposta à infecção pelo *L. theobromae***

Os objetivos deste experimento são semelhantes ao do experimento anterior. Contudo, os tempos de coletas dos caules foram mais tardios em relação à inoculação.

Quanto à análise da incidência e severidade da resinose, novamente, não foi possível visualizar diferenças entre os dois clones de cajueiro alvos deste estudo em nenhum dos dias analisados.

Quanto ao teor de fenóis solúveis (Figura 28), pode-se observar que ocorreu maior concentração no clone suscetível, em quatro dos tempos analisados, 10, 20, 30 e 50 DAI, com aumentos de 47%, 28%, 50% e 27%, respectivamente, em comparações com o resistente. Também, a quantidade de taninos (Figura 29) foi maior no clone CCP 76 em alguns dos tempos experimentais, 10, 30 e 40 DAI, com aumentos de 57%, 42% e 31%, respectivamente, sobre aqueles do clone resistente.

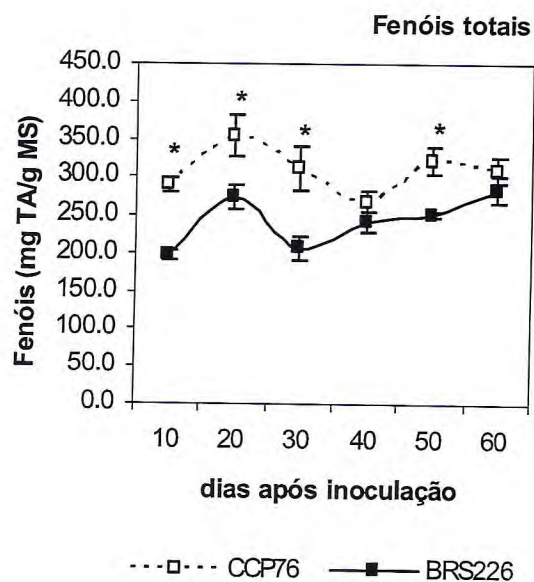
O teor de peróxido de hidrogênio (Figura 30) sofreu oscilações ao longo dos tempos de coleta, exibindo diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ), entre os clones, somente no tempo de 10 DAI, quando foi maior 1,6 vezes no clone suscetível, e 50 DAI, quando o teor foi mais elevado 1,22 vezes no clone resistente.

O perfil de proteínas (Figura 31) foi bastante semelhante entre os diferentes clones, resistente e suscetível, ao longo do tempo. Da mesma forma, as atividades da SOD (Figura 32) e APX (Figura 33) foram semelhantes entre os dois clones estudados. Nenhuma atividade catalásica foi detectada, como nos experimentos anteriores.

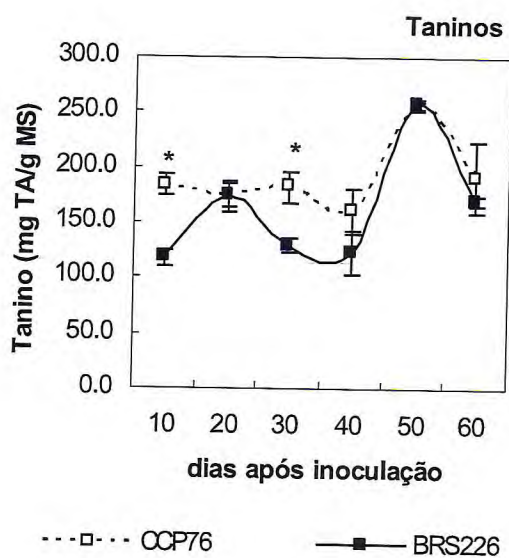
Quanto à POX (Figura 34), maior atividade dessa enzima foi observada no clone suscetível em quatro dos tempos analisados, 10, 30, 40 e 60 DAI com aumentos de 230%, 60%, 34% e 50%, respectivamente. Já a PAL exibiu maior atividade nos tempos 10 e 20 DAI (53% e 44%, respectivamente) no clone resistente. Entretanto, no último dia de coleta, 60 DAI, essa atividade foi maior 157% no clone suscetível (Figura 35).

O perfil dos clones CCP 76 e BRS 226 foi bastante semelhante quanto à atividade glucanásica (Figura 36). Contudo, aos 50 DAI, a atividade dessa enzima foi mais pronunciada 76% maior no clone resistente. Já a enzima QUI (Figura 37), foi significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior no clone resistente em três dos tempos analisados: 10, 30 e 50 DAI sendo, respectivamente, 97%, 97% e 226%, maiores.

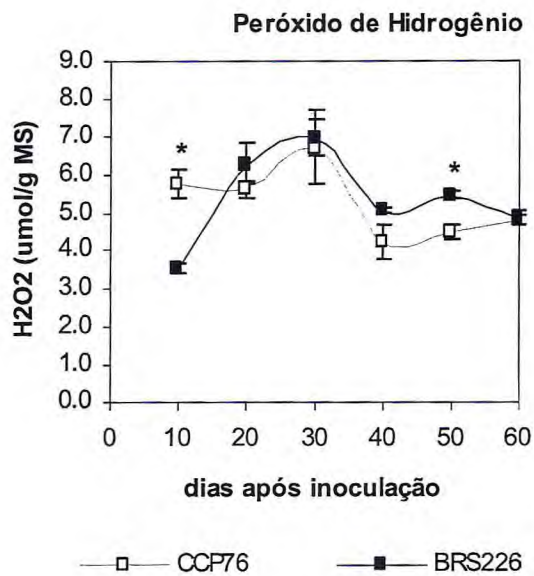




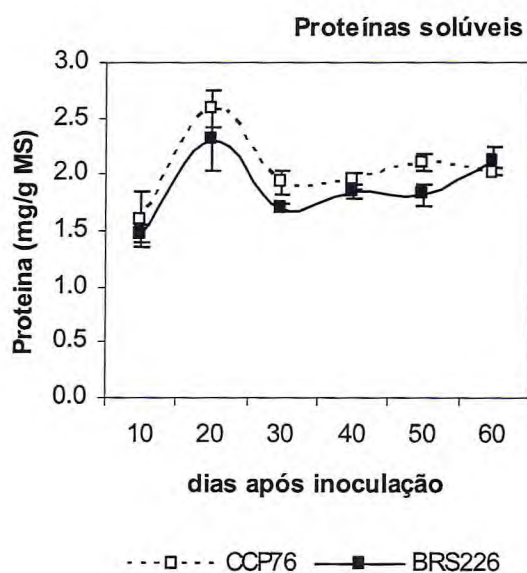
**Figura 28.** Teor de fenóis solúveis em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 29.** Teor de taninos em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

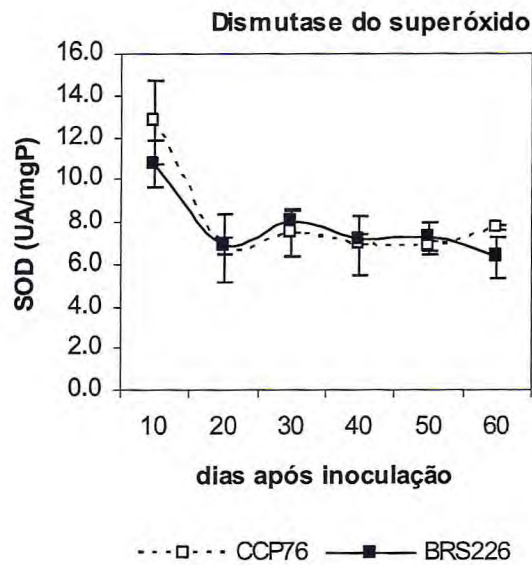


**Figura 30.** Teor de peróxido de hidrogênio em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

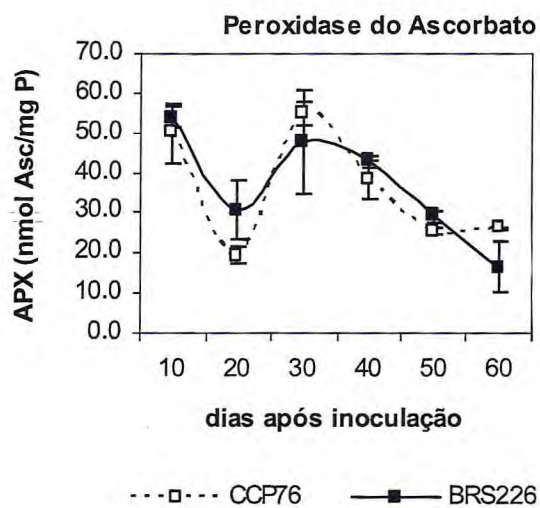


**Figura 31.** Teor de proteínas em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

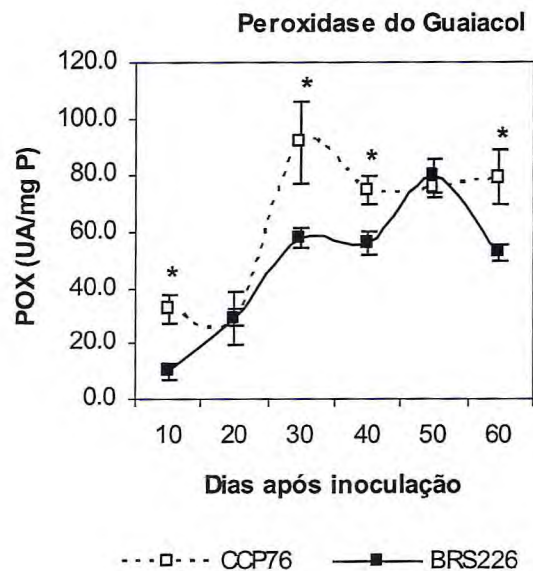




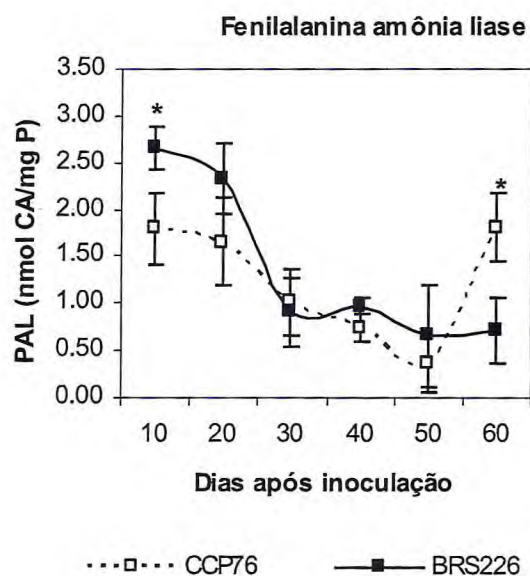
**Figura 32.** Atividade da enzima dismutase do superóxido em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 33.** Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

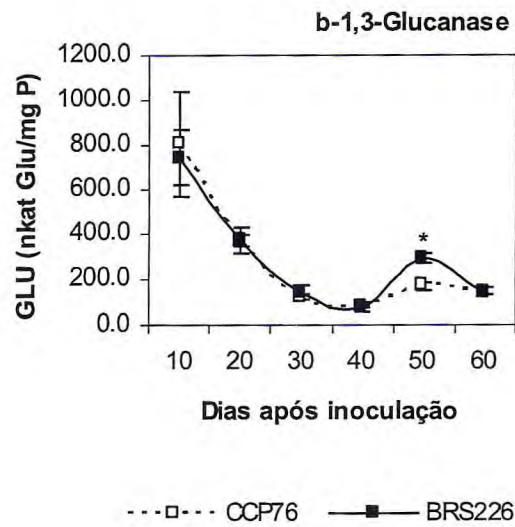


**Figura 34.** Teor da enzima peroxidase do guaiacol em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

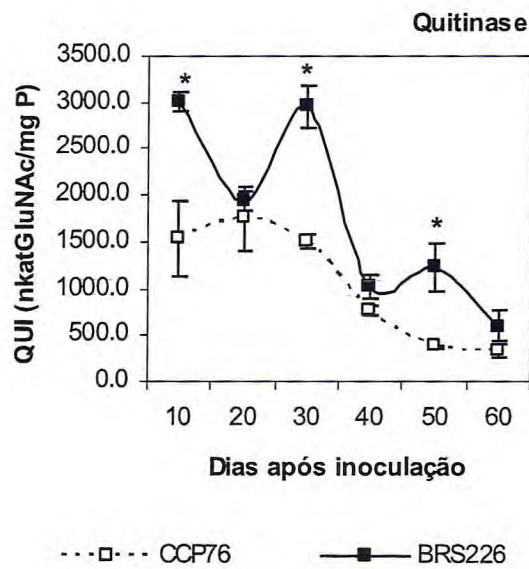


**Figura 35.** Teor da enzima fenilalanina amônia liase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.





**Figura 36.** Teor da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 37.** Teor da enzima quitinase em caule de mudas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, em diferentes dias após inoculação (DAI) com *L. theobromae*. Barras indicam desvio padrão. \* denota diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

### **5.5 Experimento IV – Análise bioquímica comparativa de ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadios e apresentando sintomas da resinose**

Este experimento foi realizado a fim de se conhecer o perfil de diversos compostos e enzimas relacionados a defesa de plantas em ramos de plantas adultas de cajueiro de contrastantes clones, tanto sadios quanto apresentando sintomas típicos da resinose.

Em ambos os clones, foi observado aumento de concentração de fenóis na condição do caule apresentando sintomas da resinose (Figura 38). Este aumento atingiu valores levemente maiores no clone resistente (179 mg/g MS) em relação ao suscetível (166,2 mg/g MS). Da mesma forma, o teor de taninos (Figura 39) foi maior na condição do caule doente nos dois clones. Entretanto, valores maiores foram alcançados no clone CCP 76 (168,9 mg/g MS) comparado com a BRS 226 (151,7 mg/g MS).

O acúmulo de peróxido de hidrogênio (Figura 40) exibiu comportamento diferenciado nos dois clones de cajueiro. No suscetível ocorreu aumento da concentração (57% maior) deste composto na condição do caule infectado. De maneira contrária, o clone resistente apresentou valores menores (35% menor) quando o caule estava doente.

O teor de proteínas (Figura 41) no caule aumentou, nos dois clones infectados comparados com os sadios. Contudo, no CCP, 76 o aumento foi de 100% em relação à sua condição de caule sadio. Já no BRS 226, o aumento foi de 55%.

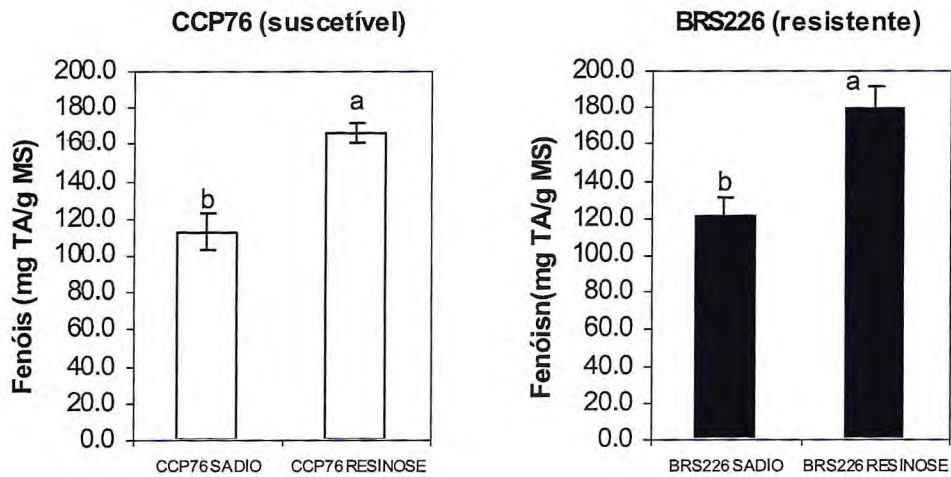
Quanto à SOD (Figura 42), foi observada uma diminuição, em média, de 70% de sua atividade, em ambos os clones, na condição de infecção. A enzima APX (Figura 43), teve sua atividade fortemente diminuída no caule apresentando sintomas da resinose, nos dois clones, CCP 76 e BRS 226, cerca de 80% e 224%, respectivamente. Nenhuma atividade catalásica foi detectada nas amostras ensaiadas.

Quanto à POX (Figura 44), no clone CCP 76, foi detectada baixa atividade peroxidásica no caule sadio. Mas, um forte aumento, cerca de 7 vezes maior, foi observado no caule infectado. Já, no clone resistente, nenhuma atividade foi detectada no caule sadio, havendo um leve aumento na condição doente. Nenhuma atividade da PAL foi detectada nas amostras dos diferentes clones, nas diferentes condições do estudo.

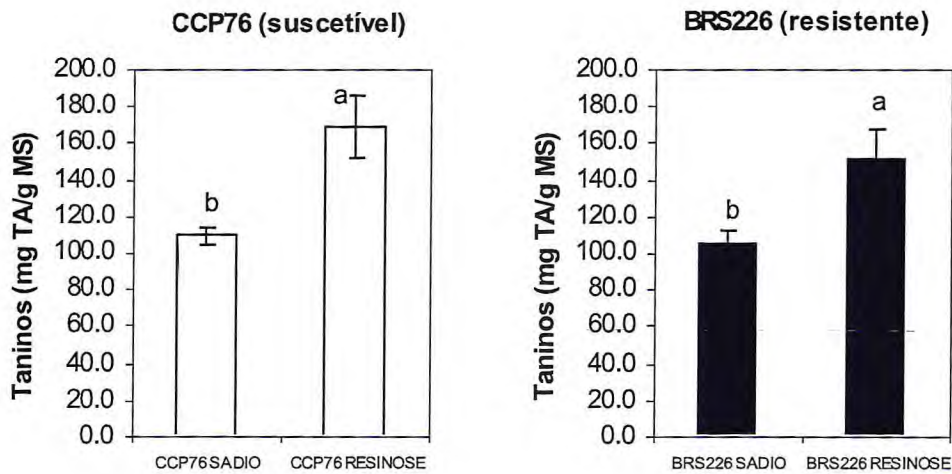
Nenhuma atividade de GLU foi detectada nos caules sadios de ambos os clones (Figura 45). Já, na condição de infecção, houve forte atividade glucanásica nos clones CCP 76



e BRS 226, 195 nkatGlu/mg P e 111 nkatGlu/mg P, respectivamente. Por fim, quanto à atividade QUI (Figura 46), no clone suscetível, não houve variação entre as condições sadia e doente do caule. Diferentemente, no clone resistente, um aumento de 122% ocorreu no caule infectado comparado com o cajueiro sadio.

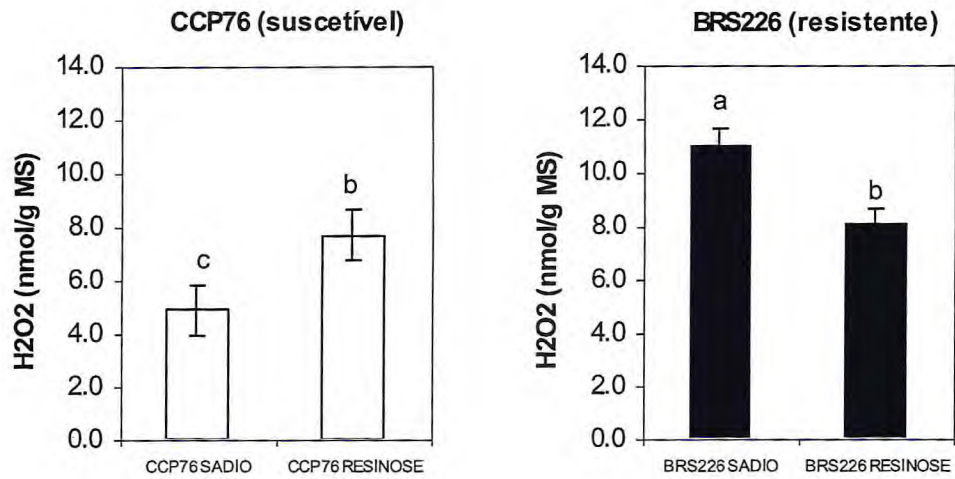


**Figura 38.** Teor de fenóis em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

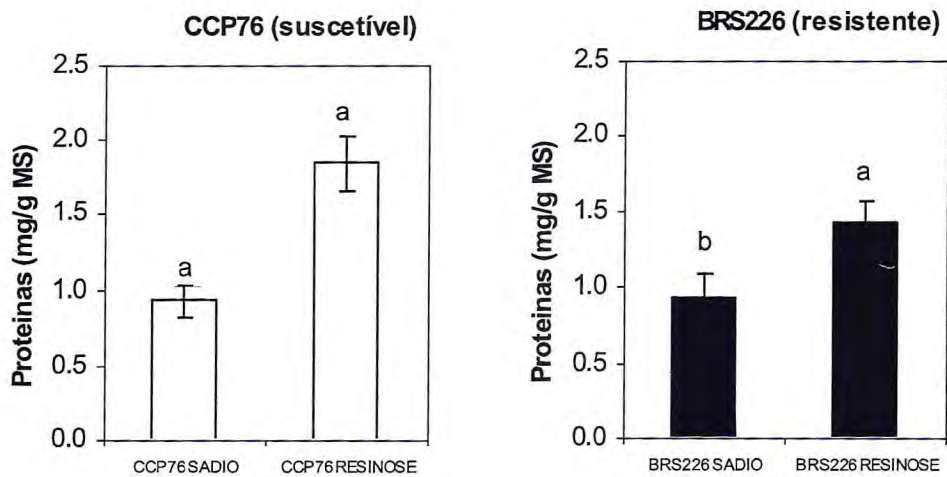


**Figura 39.** Teor de taninos em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

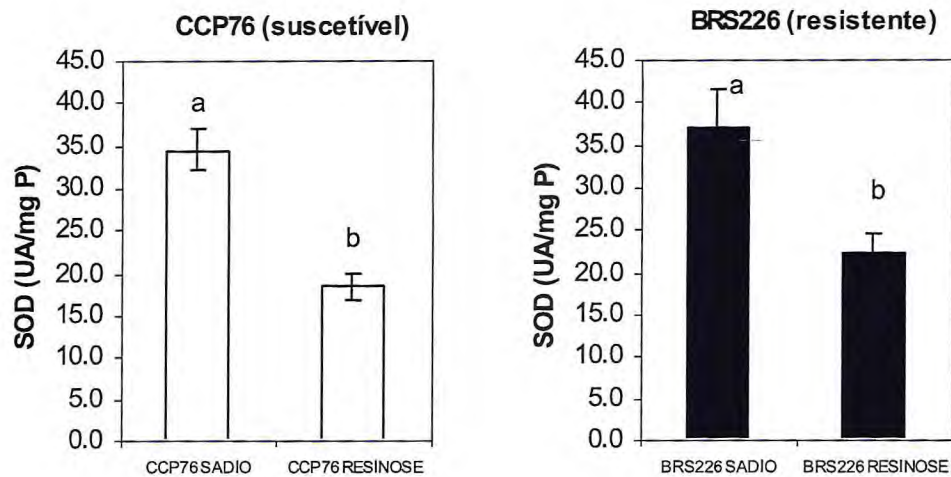




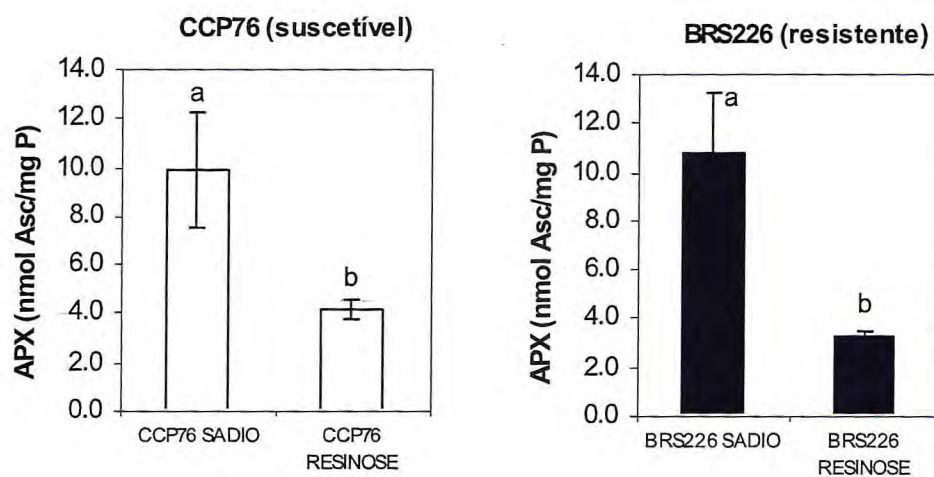
**Figura 40.** Teor de peróxido de hidrogênio em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



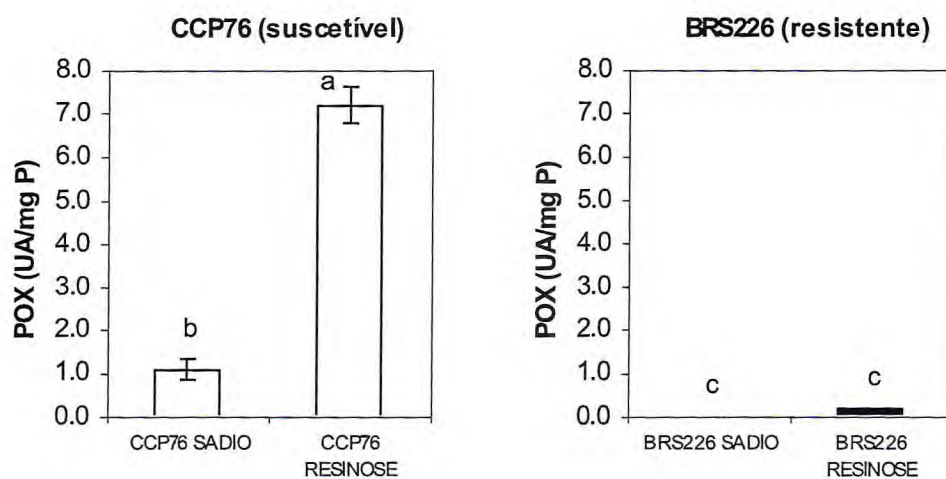
**Figura 41.** Teor de proteínas em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 42.** Atividade da enzima dismutase do superóxido em ramos de plantas adultas de cajueiro ano precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

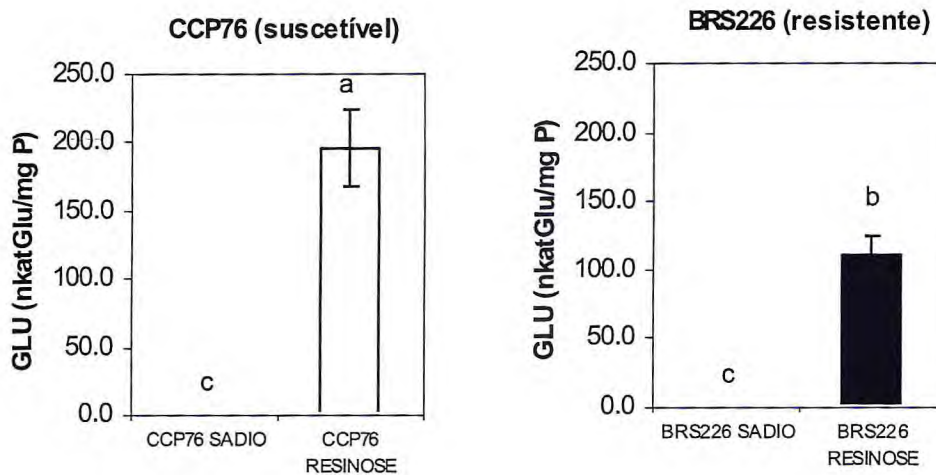


**Figura 43.** Atividade da enzima peroxidase do ascorbato em ramos de plantas adultas de cajueiro ano precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

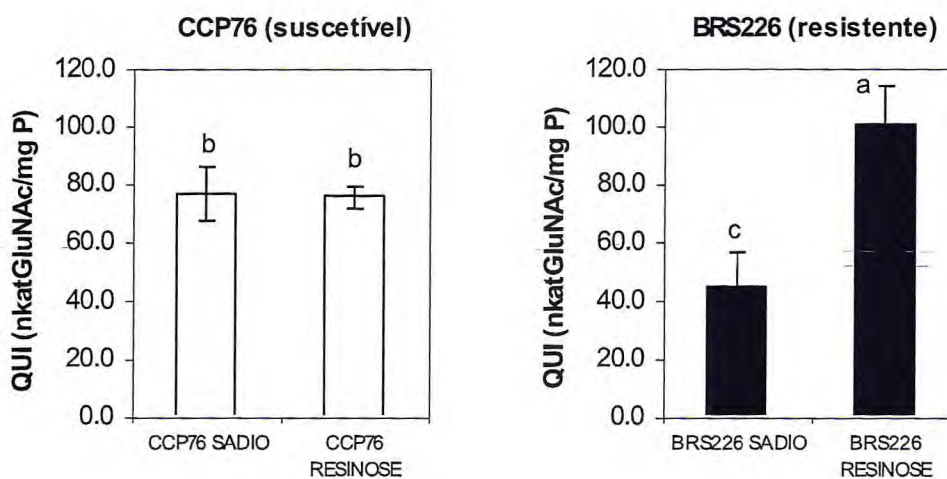


**Figura 44.** Atividade da enzima peroxidase do guaiacol em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.





**Figura 45.** Atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glucanase em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.



**Figura 46.** Atividade da enzima quitinase em ramos de plantas adultas de cajueiro anão precoce, clones CCP 76 e BRS 226, nas condições sadio e apresentando sintomas típicos da resinose. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

## 6 Discussão

O caule, em particular, de plantas lenhosas, como o cajueiro, não é de fácil manipulação pela sua grande rigidez. Tal fato se constitui um desafio para trabalhos que necessitem extrair moléculas orgânicas, como as proteínas, deste tecido. Além disso, a concentração protéica do caule do cajueiro é baixa. Portanto, a definição de um eficaz método para extração de proteínas, em especial de enzimas, é uma etapa crucial para qualquer estudo na área de bioquímica de proteínas. Como parte deste trabalho destinava-se a estudar o acúmulo de diversas enzimas envolvidas com defesa vegetal, a definição de um método adequado para extração de proteínas do caule foi uma meta importante alcançada. O método escolhido se mostra rápido, simples e compatível com o estudo de diversas enzimas de interesse, presentes no caule do cajueiro.

O tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5.2, contendo 50 mM de NaCl vem se destacando, em nosso grupo de pesquisa, como uma solução capaz de extrair eficazmente proteínas e diversas enzimas relacionadas à defesa de plantas de diferentes espécies e tecidos vegetais (Fernandes, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007; Gondim *et al.*, 2008). Mais uma vez, isto foi observado para o tecido de caule de cajueiro. Contudo, foi fundamental para o sucesso deste tampão como solução extratora de diversas enzimas de interesse, o acréscimo de PEG a 3% (Fig 6c e Fig 7). Também, foi feita a adição de PVPP a esse tampão de extração com o objetivo de remover parte de compostos fenólicos que são co-extraídos com as proteínas. Em suma, a definição de uma boa metodologia e tampão para extração de proteínas do caule do cajueiro foi crucial para o prosseguimento desse trabalho.

Em todos os experimentos analisados, não foi possível detectar a atividade da CAT. Provavelmente, isto se deve à co-extração de inibidores desta enzima, pois diversos tampões foram testados a fim de ensaiar essa enzima do caule, mas sem sucesso. Alguns trabalhos têm demonstrado a inibição da CAT por moléculas orgânicas naturais, como ácido salicílico e ácido succínico (Chen *et al.*, 1993, Panina *et al.*, 2004). Compostos inibidores podem ser induzidos nas plantas, em uma situação de infecção ou estresse e inativarem a CAT (Patterson *et al.*, 1984; Shim *et al.*, 2003). Situação semelhante pode ter ocorrido no sistema cajueiro-*L. theobromae*.



Conhecer o perfil constitutivo de diversos compostos e enzimas relacionados à defesa vegetal nos cajueiros contrastantes, CCP 76 e BRS 226 (*Experimento I*), é de grande importância para que se possa buscar correlações entre características de suscetibilidade e resistência, respectivamente, com o acúmulo diferencial dos metabólitos aqui estudados. Contudo, para o patossistema *L. theobromae* x cajueiro, os resultados obtidos não apontam para a existência destas correlações, sugerindo que a resistência do clone BRS 226 pode não estar relacionada com o conteúdo constitutivo de fenóis totais, taninos, peróxido de hidrogênio e das diversas enzimas analisadas neste experimento (Fig 8 a 17). Porém, numa situação de infecção pelo *L. theobromae*, os teores destes compostos e atividades das enzimas podem sofrer alterações de forma diferenciada nos diferentes clones de cajueiro, levando a diferentes respostas de defesa. Para isto, os experimentos seguintes foram realizados.

Nos experimentos onde houve a inoculação artificial do *L. theobromae* (*Experimentos II e III*), não foi possível avaliar os parâmetros de incidência e severidade da doença, uma vez que nenhum sintoma típico apareceu. Contudo, o re-isolamento com sucesso deste fungo, a partir do caule das mudas inoculadas, comprovou a presença do patógeno nas plantas. Além disso, o foco principal deste trabalho não é quantificar parâmetros relativos à doença e sim conhecer as respostas bioquímicas que o cajueiro exibe após ser infectado por este patógeno.

Cysne (2006) conseguiu, com sucesso, avaliar os sintomas da resinose em mudas de cajueiro inoculadas artificialmente com *L. theobromae*, cultivadas em casa de vegetação, quando submeteu as plantas a um estresse hídrico, a fim de acelerar os sintomas da doença, já que é descrita a característica oportunista deste fitopatógeno em plantas já estressadas. Porém, esta abordagem, não poderia ser utilizada neste trabalho, uma vez que se busca conhecer as bases bioquímicas da interação *L. theobromae* x cajueiro. Um novo estresse dificultaria ou até impossibilitaria a análise dos dados.

No experimento onde foram avaliadas as respostas imediatas de defesa (24 a 96 h) à infecção artificial com *L. theobromae* (*Experimento II*), foi observado que os teores de fenóis e taninos não exibem perfis de resposta diferenciada à presença do fungo nos dois clones estudados (Fig 18 e 19). Contudo, a quantidade destes compostos secundários é, em média, 12% maior no clone suscetível. Com isto, foi possível descartar uma hipótese que correlacionava a resistência do clone BRS 226 à presença de maiores teores de taninos nesse clone.



Ainda nesse experimento, foi possível observar que o  $H_2O_2$ , também, não foi acumulado, diferencialmente, nos clones contrastantes entre as condições sadia e infectada (Fig 20). Porém, o clone suscetível acumulou, em média, 20% mais que o clone resistente. Este resultado somado à observação de um maior aumento de atividade da SOD (Fig 22), enzima produtora de  $H_2O_2$ , no clone suscetível, sugerem que o *L. theobromae* poderia estar sendo favorecido neste cajueiro, já que este fungo possui hábitos necrotróficos.

Outro importante dado ressaltado neste experimento foi o maior acúmulo de duas importantes enzimas antifúngicas, a GLU (Fig 25) e a QUI (Fig 27), no clone resistente. Maior expressão de enzimas antifúngicas é esperada em interações planta-fungo devido à capacidade dessas enzimas em lisar a parede celular desses patógenos, composta por  $\beta$ -1,3-glucano e quitina, e pelas mesmas liberarem pequenos oligômeros de açúcar, ao degradarem estes polímeros, capazes de potencializar respostas de defesa vegetal (Hahlbrock *et al.*, 1995; Cota *et al.*, 2007). A detecção de maior atividade destas enzimas no clone BRS 226 indica que a característica de resistência deste clone possa, também, estar correlacionada com maior acúmulo de enzimas antifúngicas logo após a infecção com *L. theobromae*.

No experimento de repostas mais tardias (10 a 60 DAI) do cajueiro à infecção artificial com *L. theobromae* (*Experimento III*), novamente, o teor de fenóis (Fig 28), em especial, e de taninos (Fig 29) foi mais elevado no clone suscetível, reforçando que a característica de resistência do BRS 226 pode não estar correlacionada com o acúmulo destes compostos. Outro resultado semelhante entre este experimento e o experimento anterior, de repostas rápidas ao patógeno (24 a 96 hai), foi a maior detecção das enzimas com ação antifúngicas, GLU (Fig 36), em menor intensidade, e a QUI (Fig 37), que teve sua atividade fortemente aumentada em três tempos analisados (10, 30 e 50 DAI). Novamente, estas enzimas parecem estar correlacionadas com a característica de resistência do clone BRS 226.

Além do interesse em conhecer as respostas do cajueiro à infecção pelo patógeno *L. theobromae* em mudas sob condições controladas, este trabalho teve o objetivo de avaliar o perfil de compostos e enzimas ligados à defesa de plantas em cajueiro adulto, cultivado em condições de campo (*Experimento IV*). Por isto, buscou-se coletar ramos em uma importante fazenda produtora de castanha, Fazenda Planalto – PI, área bastante afetada pela resinose.

Em condições de campo, é bem evidente a característica de suscetibilidade do cajueiro CCP 76 ao ataque do *L. theobromae*. Quase 100% das plantas deste clone apresentam sintomas típicos da resinose: escurecimento e inchaço do caule, além da exudação da resina



no estágio mais avançado da doença. É, também, notória a resistência do cajueiro BRS 226 à ocorrência desta doença, demonstrada pela enorme dificuldade em se obter ramos apresentando sintomas de resinose. Vale ressaltar que os ramos do cajueiro CCP 76 coletados para o estudo apresentavam regiões mais infectadas e com maiores áreas de necrose do que ramos do clone BRS 226, que exibiam sintomas mais leves da doença. As árvores de cajueiro dos dois clones de onde foram coletados os ramos estudados encontravam-se em áreas de plantio bastante próximas, estando submetidas, assim, às mesmas condições ambientais e à pressão do patógeno.

Em plantas adultas, cultivadas no campo, o acúmulo de fenóis e taninos não explica as características contrastantes dos clones de cajueiro (Fig 38 e 39). Assim, a hipótese que correlaciona a resistência do clone BRS 226 com maiores teores de taninos neste cajueiro não encontra respaldo nos experimentos anteriores nem aqui, sugerindo fortemente ser esta hipótese falha.

De maneira semelhante, a análise das enzimas SOD (Fig 42), APX (Fig 43), POX (Fig 44) e PAL não explicam as características opostas dos clones estudados. A forte atividade da POX detectada apenas no clone CCP 76 infectado pelo *L. theobromae*, deve estar relacionada à reconstituição do tecido afetado e limitação da infecção, pois o caule deste clone apresentava fortemente os sintomas da resinose, com grandes regiões de necrose e a POX exerce função no processo de enrijecimento da parede celular vegetal (Cavalcanti *et al.*, 2007).

Por outro lado, o acúmulo diferencial de  $H_2O_2$  (Fig 40) parece ter relação com a suscetibilidade/resistência do cajueiro à resinose. O maior acúmulo deste composto no clone suscetível pode indicar o estabelecimento de uma condição favorável ao desenvolvimento do patógeno, uma vez que o mesmo possui hábitos necrotróficos. Já é relatado que esse tipo de patógeno, paradoxalmente, se aproveita das reações de defesa da planta – explosão oxidativa e resposta hipersensitiva – para exercer sua patogenicidade (Govrin e Levine, 2000; Mayer *et al.*, 2001).

Com relação às enzimas de ação antifúngica, suas atividades foram aumentadas na condição de infecção do caule nos dois clones, com exceção da QUI no clone suscetível (Fig 45 e 46). Esse aumento do teor da QUI no clone resistente foi de 33 % no ramo infectado quando comparado com a condição sadia. Assim, mais uma vez, há fortes evidências que a característica de resistência do BRS 226 possa estar correlacionada, também, com o maior

acúmulo dessas proteínas antifúngicas, em especial a QUI. Pesquisas com plantas transgênicas expressando teores elevados de GLU e, principalmente, QUI, têm sido realizadas a fim de aumentar a proteção dos vegetais contra o ataque de patógenos. Com exemplo, a alta expressão de QUI está envolvida com o aumento da resistência de plantas transgênicas de arroz ao mofo cinzento (*gray-mold; Botrytis cinerea*) (Kishimoto *et al.*, 2002) e à queima-das-bainhas (*sheath blight; Rhizoctonia solani*) (Datta *et al.*, 2001). Para este último patossistema, arroz-*Rhizoctonia solani*, a expressão combinada de genes de QUI e GLU produziram elevados níveis de resistência, em torno de 60% (Sridevi *et al.*, 2008). Para o patossistema cajueiro-*L. theobromae*, parte da resistência pode estar associada ao maior acúmulo destas proteínas no caule.

## 7 Comentários finais

Neste trabalho, diversos experimentos foram montados a fim de se compreender as respostas bioquímicas do cajueiro à infecção pelo fitopatógeno *L. theobromae* e, em especial, quais moléculas (dentre as estudadas) estariam envolvidas com as características de resistência do clone BRS 226. Então, diversas abordagens foram utilizadas: experimentos sob condições controladas (*Experimento I*) e com infecção artificial do patógeno (*Experimento II e III*); experimentos com plantas adultas cultivadas no campo infectadas naturalmente (*Experimento IV*); além de análises em diferentes períodos de tempo após a infecção do *L. theobromae*: horas (24, 48, 72 e 96 hai); dias (10, 20, 30, 40, 50 e 60 dai) e longos períodos (indeterminado; *Experimento IV*).

Apesar da evidente importância de todos os compostos aqui estudados na defesa das plantas contra patógenos, somente alguns parecem estar envolvidos na proteção do cajueiro ao ataque do fungo *L. theobromae*. Há indícios que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja mais acumulado no clone suscetível (*Experimento I e II*) e em resposta ao patógeno no estágio mais avançado da doença (*Experimento IV*). Na presença do fungo, ocorre a diminuição desse composto no clone BRS 226 e isso, possivelmente, dificulta o desenvolvimento do *L. theobromae*, que possui hábitos necrotróficos. Por outro lado, teores mais elevados de peróxido no cajueiro CCP 76 podem levar ao aumento da área de necrose do tecido, facilitando, assim, o estabelecimento deste patógeno. Com relação às enzimas, ficou bastante claro o acúmulo diferencial das proteínas antifúngicas, GLU e QUI, entre cajueiros contrastantes nos diversos experimentos. Maiores



atividades destas enzimas, em especial a QUI, foram observados no clone resistente. Vários estudos correlacionam aumento da expressão destas enzimas com proteção de plantas à patógenos (Cavalcanti *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2007; Profotová *et al.*, 2007). Este é o primeiro estudo que buscou conhecer moléculas e vias bioquímicas que estejam relacionadas às respostas de defesa do cajueiro á infecção pelo *L. theobromae*.



## Capítulo 3

ESTUDO PROTEÔMICO DA INTERAÇÃO DO  
CAJUEIRO ANÃO PRECOCE COM O FUNGO  
*LASIODIPLODIA THEOBROMAE*.



## 1 Caracterização do problema e Justificativa

Pesquisas proteômicas se apresentam cada vez mais como uma poderosa ferramenta para se compreender o metabolismo das células de diferentes organismos nas mais variadas condições ambientais. Isso está sendo possível devido ao contínuo aperfeiçoamento dos equipamentos e protocolos que envolvem essa técnica (Jorrín-Novo *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, a abordagem proteômica tem sido utilizada de maneira crescente, também, para estudos com plantas, em especial, a fim de compreender os eventos celulares envolvidos com a resposta dos vegetais aos mais variados estresses, tanto abióticos quanto bióticos (Salekdeh e Komatsu, 2007; Qureshi *et al.*, 2007; Quirino *et al.*, 2010). Apesar dessa notória evolução não somente na quantidade, mas qualidade dos trabalhos de proteômica de plantas, esse progresso ainda é lento quando comparado com estudos com humanos e microorganismos. (Jorrín-Novo *et al.*, 2009).

Dentre outras técnicas, a separação de proteínas por meio da eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e subsequente identificação por espectrometria de massas (MS), auxiliadas por ferramentas de bioinformática, vem sendo a estratégia mais empregada em estudos proteômicos vegetais (Wang *et al.*, 2006; Oeljeklaus *et al.*, 2009; Quirino *et al.*, 2010). Porém, uma etapa fundamental para esse tipo de trabalho é a preparação de uma amostra protéica de alta qualidade, isto é, rica em diferentes proteínas e livre de outras moléculas biológicas. Para tecidos vegetais, isto representa um grande desafio devido a alta concentração de compostos interferentes, tais como pigmentos, polissacarídeos, lipídeos e metabólitos secundários. Estes compostos são co-extraídos com as proteínas, resultando em arrastados verticais e horizontais, manchas e número reduzido de *spots* bem resolvidos nos mapas bidimensionais. Adicionalmente, vários tecidos vegetais contêm baixas concentrações de proteínas, que podem ser hidrolisadas ou oxidadas por proteases e enzimas oxidativas, respectivamente, durante a extração protéica. Um protocolo apropriado de preparação das amostras irá depender das propriedades do tecido vegetal e das proteínas de interesse, além, também, do tipo de análise que será realizada subsequente (Carpentier *et al.*, 2005; Gómez-Vidal *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Sheoran *et al.*, 2009).

Uma outra questão relacionada à pesquisa com plantas é que ela vem sendo detalhada em 'organismos modelos', como *A. thaliana* e espécies de grande interesse econômico, como



o arroz (*O. sativa*) e uva (*V. vinifera*), embora diversas outras espécies sejam essenciais para o mundo como fonte de alimento e energia (Carpentier *et al.*, 2008). Além disso, informações sobre 'plantas modelos' não são apropriadas para todas as espécies vegetais. Dessa forma, é essencial que estudos sejam conduzidos para melhor caracterizar as 'espécies não-modelos'.

O cajueiro é considerado uma das mais importantes espécies cultivadas das regiões tropicais do mundo, ocupando lugar de destaque dentre as plantas frutíferas, em face da crescente comercialização de seus produtos. No Brasil, a cajucultura destaca-se pela grande área cultivada e elevada produção de castanha, estando o estado do Ceará no patamar de principal produtor nacional. Atualmente, a produtividade desta espécie exhibe níveis baixos, reflexo da deficiente infra-estrutura nas áreas cultivadas (Melo, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2003; Oliveira 2008). Além disso, no semi-árido nordestino, onde o cajueiro é intensamente explorado, as plantas estão sujeitas a diversos estresses ambientais, tanto abióticos (seca, temperatura elevada, salinidade dos solos) quanto bióticos. Com relação aos últimos, várias doenças afetam o cajueiro, trazendo enormes perdas econômicas. Dentre elas, a resinose, causada pelo fungo *L. theobromae*, é, atualmente, a doença mais importante nas condições do semi-árido brasileiro. Vários surtos epidêmicos têm ocorrido nos últimos anos em decorrência da debilidade das plantas estressadas, pelas condições ambientais e, principalmente, do plantio em larga escala do clone comercial CCP 76, altamente suscetível à doença. Recentemente, a EMBRAPA caracterizou o clone BRS 226 como resistente à resinose (Cardoso *et al.*, 1998; 2006 Paiva *et al.*, 2001; 2002; 2008).

Apesar da importância da cultura do cajueiro, são poucos os estudos que buscam compreender os impactos destes fatores de estresse sobre a fisiologia do cajueiro. Ainda mais raros, são os estudos bioquímicos que busquem identificar e compreender o papel de diversos metabólitos, especialmente as proteínas, nos mecanismos de proteção desta planta aos estresses. Isso pode ser comprovado pela quase inexistência tanto de artigos científicos publicados a fim de identificar proteínas de defesa do cajueiro quanto de genes e proteínas depositados em bando de dados. Hoje, no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) há apenas 30 seqüências nucleotídicas descritas para a espécie *A. occidentale*, não havendo nenhuma EST's (*Expressed Sequence Tags*) e apenas 5 proteínas. Isso reforça a urgência em se iniciar estudos que visem conhecer importantes metabólitos do cajueiro, principalmente, àqueles com função biológica relevante, como resistência a doenças e pragas.

Usar o potencial de uma abordagem proteômica para compreender respostas do cajueiro frente aos diversos impactos ambientais, em especial, ao ataque de patógenos, é extremamente interessante, uma vez que as proteínas são as principais armas na batalha entre plantas e patógenos (Ferreira *et al.*, 2007). Por fim, não há pesquisas que busquem identificar proteínas do cajueiro expressas no caule e que tenham envolvimento com as respostas de defesa do cajueiro ao ataque do *L. theobromae*.

Diante do exposto, este trabalho buscou determinar uma metodologia eficaz de extração de proteínas de caule de cajueiro anão, compatível com 2D-PAGE e MS, a fim de permitir, subsequentemente, a realização de um estudo proteômico diferencial entre dois clones contrastantes de cajueiro, CCP 76 e BRS 226, suscetível e resistente à resinose, respectivamente.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Geral**

Estabelecer um protocolo eficiente de preparação de amostra protéicas do caule de cajueiro, elaborar mapas bidimensionais de boa qualidade e identificar proteínas presentes no caule, em especial, àquelas que apresentem expressão diferenciada nos clones contrastantes de cajueiro anão precoce, CCP 76 e BRS 226, respectivamente, suscetível e resistente à resinose.

### **2.2 Específicos**

Estabelecer um protocolo de preparação de amostras do caule do cajueiro compatíveis com a realização de eletroforese bidimensional, a fim de se obter ótimo rendimento, solubilização e baixa contaminação dos extratos protéicos;

Obter mapas bidimensionais com alta qualidade e reprodutibilidade de caule de cajueiro;

Realizar análise diferencial (Programa ImageMaster<sup>®</sup> 2D Platinum versão 5.0 Amersham Biociences) dos géis, para identificar os *spots* protéicos cujos padrões foram modificados (reprogramação genética) no caule, após a infecção com o *L. theobromae*;

Identificar proteínas do caule, tanto constitutivamente quanto em resposta à infecção pelo *L. theobromae*;



## **3 Materiais**

### **3.1 Material biológico**

Ramos de plantas adultas dos clones CCP 76 e BRS 226 sadios ou apresentando sintomas de infecção pelo *L. theobromae* foram coletados na Fazenda Planalto, pertencente à Companhia Industrial de Óleos do Nordeste (CIONE) localizada na BR 020, km 4, município de Pio IX, Estado do Piauí. As coordenadas geográficas da Fazenda são: Latitude de 6° 34' e 24,5'' S; Longitude de 40° 50' e 39'' W; Altitude de 730 m; temperatura média de 24 °C (18 – 36 °C) e pluviosidade média de 609,7 mm. Nessa área há grande incidência da resinose. Após a coleta, os ramos foram armazenados à -20 °C e trazidos para o laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa do DBBM da UFC.

### **3.2 Reagentes**

Coomassie Brillhante Blue G-250, piridina, polietileno glicol (PEG), polivinilpolipirrolidona (PVPP), β-mercaptoetanol (2-ME) foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil.

3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), Ditiotreitól (DTT), ácido etileno diaminotetracético (EDTA), Fluoreto de Fenilmetil sulfonil (PMSF), iodoacetamida, óleo mineral, tiouréia, tiras do focalização isoeletrica, uréia, IPG buffer 3-10 foram obtidos da Amersham Bioscience, USA

O reagente Fenol saturado com Tris, pH 8,0 foi obtido da Acros Organics, USA. E a enzima Tripsina foi adquirida da Promega, Madison, WI, USA.

Os demais reagentes utilizados foram obtidos comercialmente de diferentes fornecedores e possuíam grau analítico.

## **4 Metodologia**

### **4.1 Estabelecimento de protocolo de extração de proteínas do caule de cajueiro para análise proteômica**

Para a realização dos testes de extração protéica, os ramos coletados das plantas adultas de cajueiro, clone CCP 76, foram liofilizados por, aproximadamente, 10 dias e, em seguida, pulverizados em moinho até obter um pó bastante fino e armazenados a -20°.

As principais metodologias avaliadas estão descritas nos itens a seguir.

#### 4.1.1 Método 1

Este método foi baseado no descrito por Vasconcelos *et al.*, 2005, com algumas modificações. Cerca de 1,0 g do pó do caule foi colocado em contato com 13,0 mL de Tampão Piridina 0,05 M, pH 5,0, contendo 10 mM de Tiouréia, 1% de SDS, 3% de PEG e 1% de PVPP por cerca de 2 horas, a 4° C sob vigorosa agitação. Em seguida, a suspensão foi centrifugada (15.000 x g, a 4 °C, 30 min) e o sobrenadante submetido à precipitação com solução de acetona contendo 10% de TCA e 0,07% de 2-ME, na proporção 1:4 (v/v), a -20 °C, *overnight*. Depois disso, a amostra foi centrifugada (20.000 x g, 4 °C, 10 min) e o precipitado submetido a duas lavagens com metanol (100%), seguidas de duas lavagens com acetona (100%). O precipitado foi totalmente seco em dessecador contendo sílica gel a 4 °C e ressuspendido em solução de uréia:tiouréia (7 M:2 M). Uma última centrifugação foi realizada (15.000 x g, 4 °C, 10 min) e o sobrenadante (Extrato 1) foi utilizado para dosagem de proteínas e análise por 2D-PAGE.

#### 4.1.2 Método 2

Este método baseou-se no descrito por Araújo-Filho (2010), com poucas modificações. Cerca de 1,0 g do pó do caule foi posto em contato com 13,0 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo 20% de glicerol, 10 mM de EDTA, 1,0 mM de DTT, 1,0 mM de PMSF, 3% de PEG e 1% de PVPP por cerca de 2 horas a 4° C sob vigorosa agitação. Em seguida, a suspensão foi centrifugada (15.000 x g, a 4 °C, por 30 min) e o sobrenadante submetido à precipitação com solução de acetona contendo 10% de TCA e 0,07% de 2-ME, na proporção 1:4 (v/v), a -20 °C, *overnight*. Depois disso, a amostra foi centrifugada (15.000 x g, 4 °C, 10 min) e o precipitado submetido a duas lavagens com metanol (100%), seguidas de duas lavagens com acetona (100%). O precipitado foi totalmente seco em dessecador contendo sílica gel a 4 °C e ressuspendido em solução de uréia:tiouréia (7 M:2 M). Uma última centrifugação foi realizada (15.000 x g, 4 °C, 10 min) e o sobrenadante (Extrato 2) foi utilizado para dosagem de proteínas e análise por 2D-PAGE.



#### 4.1.3 Método 3

Este método é denominado ‘extração fenólica’, descrito por Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações. Cerca de 1,0 g do pó do caule foi ressuscitado em 15,0 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0, contendo sacarose 0,7 M, 0,1 M de KCl, 0,05 M de EDTA, 2 mM de PMSF, 2% de 2-ME, 0,5% de Triton X-100 e 1% de PVPP e agitado por 1 h, a 4 ° C. Um volume igual de reagente Fenol-Tris, pH 8,0 (Acros Organics) foi adicionado e a amostra homogeneizada por 30 min a 4 ° C. Após centrifugação (10.000 x g, 4 ° C, 20 min), a fase fenólica superior foi coletada e extraída novamente com o mesmo tampão de extração. Em seguida, as proteínas foram precipitadas em cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio (0,1 M) em metanol, a -83 ° C, overnight. Após centrifugação (16,000 x g, 4 ° C, 20 min) o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol gelado e, após, duas vezes com acetona gelada. Entre cada etapa de lavagem, a amostra foi incubada a -20 ° C, por 30 min e centrifugada a 16,000 x g, a 4 ° C, por 20 min. O precipitado foi seco em dessecador contendo sílica gel a 4 ° C e ressuscitado em solução de uréia:tiouréia:chaps (7 M:2 M:2%) por sonicação por 20 min em temperatura ambiente, seguido por agitação a 200 x rpm por 20 min a 4 ° C. Por fim, uma centrifugação foi realizada (10.000 x g; 10 min; 4 ° C) e o sobrenadante (Extrato 3) foi utilizado para dosagem de proteínas e análise por 2D-PAGE.

#### 4.1.4 Método 4

Este método é uma variação da ‘extração fenólica’, descrito por Wang *et al.* (2003) e Yao *et al.* (2006), com algumas modificações. Aproximadamente 1,0 g do pó do caule foi homogeneizado em 25 mL de uma solução gelada de acetona durante 1 h a 4 ° C e armazenada a -83 ° C, *overnight*. A mistura foi centrifugada (18,000 x g, 4 ° C, 30 min) e o precipitado resultante foi lavado, sequencialmente, com solução de 0,1 M de acetato de amônio em metanol a 80% gelado e acetona a 80% gelada. Entre cada lavagem o pellet foi homogeneizado e centrifugado a 18,000 x g, por 30 min, a 4 ° C. Para extração protéica, o *pellet* seco foi ressuscitado em 15,0 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo 30% de sacarose, 2% de SDS, 1 mM de PMSF, 2% de 2-ME e 1% de PVPP. A amostra foi agitada por 1 h, a 4 ° C e um volume igual de reagente Fenol-Tris, pH 8,0 (Acros Organics) foi adicionado e a suspensão homogeneizada por 30 min, a 4 ° C. Após centrifugação (10.000 x g,

4° C, 20 min), a fase fenólica superior foi coletada e re-extraída com 15,0 mL do tampão de extração. Em seguida, as proteínas presentes na fase fenólica foram precipitadas em cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio em metanol (100 %), a -83 °C, overnight. Após centrifugação (16,000 x g, 4 °C, 20 min), o precipitado foi lavado duas vezes com metanol gelado e uma vez com acetona gelada a 80%. Entre cada lavagem, o precipitado foi ressuspendido e incubado a -20 °C, por 30 min. Após centrifugação a 16,000 x g, a 4 °C, por 20 min, o *pellet* foi seco em dessecador contendo sílica em gel a 4 °C e, por fim, ressuspendido em solução de uréia:tiouréia:chaps (7 M:2 M:2%) por sonicação por 20 min à temperatura ambiente, seguido por agitação a 200 x rpm por 20 min a 4 ° C. Por fim, a suspensão foi centrifugada (10.000 x g; 10 min; 4 °C) e o sobrenadante (Extrato 4) foi utilizado para dosagem de proteínas e análise por 2D-PAGE.

#### 4.1.5 Método 5

Este método é uma variação do Método 4. Cerca de 1,0 g do pó do caule foi homogeneizado em 25 mL de uma solução gelada de acetona contendo 10% de TCA e 2% de 2-ME durante 1 h a 4 °C e armazenada a -83 °C *overnight*. Após centrifugação (18,000 x g, 30 min, 4 °C), o precipitado resultante foi lavado duas vezes com acetona contendo 2% de 2-ME e centrifugado a 18,000 x g, por 30 min, a 4 °C. O precipitado foi seco e as proteínas extraídas em 15,0 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,65, contendo 30% de sacarose, 2% de SDS, 1 mM de PMSF, 2% de 2-ME e 1% de PVPP. A amostra foi homogeneizada por 1 h, a 4° C e um volume igual de reagente Fenol-Tris, pH 8,0 (Acros Organics) foi adicionado. A suspensão foi agitada por 30 min a 4 °C. Após centrifugação (10.000-x g, 4° C, 20 min), a fase fenólica superior foi coletada e re-extraída com 15,0 mL do tampão de extração. Em seguida, as proteínas presentes na fase fenólica foram precipitadas em cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio (0,1 M) em metanol, a -83 °C, overnight. Após centrifugação (16,000 x g, 4 °C, 20 min), o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol gelado e, após, duas vezes com acetona gelada a 80%. Entre cada lavagem, o precipitado foi incubado a -20 °C, por 30 min e a suspensão centrifugada a 16,000 x g, a 4 °C, por 20 min. O precipitado foi seco em dessecador contendo sílica gel a 4 °C e ressuspendido em solução de uréia:tiouréia:chaps (7 M:2 M:2%) por sonicação por 20 min em temperatura ambiente, seguido por agitação a 200 rpm por 20 min a 4 ° C. Uma



última centrifugação foi realizada (10.000 x g; 10 min; 4 °C) e o sobrenadante (Extrato 5) foi utilizado para dosagem de proteínas e análise por 2D-PAGE.

Após a definição do método, foi realizado um novo teste para escolher a melhor porcentagem de acrilamida na formulação do gel de separação das proteínas na SDS-PAGE. Foram testadas as porcentagens 12,5%, 15% e 14% de acrilamida (na verdade, %T, onde T representa a soma do conteúdo dos sólidos, acrilamida e bis-acrilamida).

#### ***4.2 Análise proteômica de ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadios e apresentando sintomas típicos da resinose***

Para execução desse experimento, ramos de plantas adultas de cajueiro (cerca de 3 anos de idade) sadio e apresentado sintomas típicos da resinose foram coletados dos dois cajueiros alvos deste estudo: CCP 76 e BRS 226. A coleta se deu de forma aleatória em diferentes plantas, no mínimo quatro de cada, e os dois clones de onde foram retirados os ramos encontravam-se em áreas de plantio bastante próximas, estando submetidos, assim, às mesmas condições ambientais e pressão do patógeno, *L. theobromae*. Após a secção, os ramos foram congelados a -20 °C e trazidos para o Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa no DBBM da UFC, onde foram estocados a -83 °C para posterior processamento e análise.

Antes na extração protéica, os ramos foram liofilizados por, aproximadamente, 10 dias, pulverizados em moinho até obter um pó bastante fino e armazenados a -20 °C. A metodologia de extração protéica foi semelhante ao Método 4, descrito no item 4.2.4. Alíquotas das amostras contendo 300 µg de proteínas foram utilizadas para realização dos géis. A 2D-PAGE foi realizada como descrito a seguir (item 4.3).

A análise diferencial das proteínas foi realizada por observação *spot-spot* nos pares dos géis, ou seja, CCP 76 sadio x CCP 76 doente e BRS 226 sadio x BRS 226 doente, dentro de cada tempo de coleta. Foram considerados *spots* diferencialmente expressos àqueles que tiveram sua intensidade alterada, no mínimo, duas vezes.

### 4.3 Dosagem de proteínas e Eletroforese bidimensional

A determinação dos teores de proteínas foi feita seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados à alíquotas de 0,1 mL dos extratos totais. Após 10 minutos, as leituras das absorvâncias foram feitas a 595 nm em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Albumina sérica bovina foi utilizada para obtenção de uma curva padrão e definição do fator de correção, necessário para determinar o teor de proteínas solúveis nos extratos.

Para eletroforeses bidimensionais, primeiramente, as proteínas foram separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através da focalização isoelétrica (IEF), usando o sistema Ettan IPGphor II (Amersham Bioscience). Foram utilizadas fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm, pH 3-10 ou pH 4-7. As amostras foram solubilizadas em solução de rehidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 65 mM, triton-X100 1%, tampão IPG 0,5% e azul de bromofenol) e aplicadas nas fitas, que foram rehidratadas, passivamente, durante 16 h em cubas de rehidratação “Reswelling Tray” (Pharmacia Biotech). E, após, submetidas ao processo de separação utilizando o programa: 200 V por 2 h; 500 V por 2 h; 5000 V por 2 h; e 10.000 V até atingir 20.000 Volts/hora totais, a 20 °C.

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram equilibradas sob agitação em solução de equilíbrio e redução (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol 30%, Uréia 6 M, SDS 2%, DTT 2% e azul de Bromofenol) por 15 minutos sob agitação lenta. E, em seguida, lavadas com uma solução de alquilação (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, glicerol-30%, Uréia 6 M, SDS 2%, iodoacetamida 2,5% e azul de Bromofenol) por 15 minutos sob leve agitação.

A SDS-PAGE foi realizada em gel vertical homogêneo (14 x 14 cm). As fitas foram inseridas sobre os géis de poliacrilamida e fixadas com uma solução de 0,5 % de agarose. A separação das proteínas, de acordo com suas massas moleculares, foi realizada a 12 °C, alimentada por uma fonte Power-Pac 3000 (Bio-Rad). A corrida transcorreu em duas etapas: na primeira, foi aplicada corrente de 20 mA/gel, durante 20 min, e, na segunda, 30 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel (aproximadamente, 5:00 h).

As proteínas foram visualizadas através do coramento com *Comassie Brilliant Blue* coloidal (Candiano, 2004). As imagens dos géis com as proteínas coradas foram obtidas através do ImageScanner (Amersham Biosciences) e analisadas pelo programa LabScan v. 5.0



(GEHealthcare). A análise das imagens foi feita pelo programa ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE-Healthcare) através de detecções dos *spots* manual e automática, feita pelo programa. Pelo programa, foram estimados os pontos isoeletricos e as massas moleculares de cada *spot*.

#### ***4.4 Processamento dos spots, Espectrometria de massas e Identificação das proteínas de interesse***

*Spots* protéicos de interesse foram recortados dos géis corados com CBB colloidal, descorados e digeridos com tripsina (Promega, Madison, WI, USA). Resumidamente, *spots* excisados foram descorados com solução de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM/50% acetonitrila (ACN) até a remoção completa do corante. Em seguida, as partículas foram desidratadas duas vezes em ACN 100% por 10 min, até que se tornassem opacas, e, então, secas a vácuo por 30 min. O pedaços de gel secos foram incubados com tripsina grau sequenciamento (10 ng/ $\mu\text{L}$  em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM) à 37 °C em banho-maria, por 16 h. Os peptídeos tripsinizados foram extraídos de cada *spot*-gel com solução de ACN 50% e ácido trifluoroacético 5%, com auxílio de sonicador, por 30 min (3 vezes). Soluções contendo os peptídeos foram secas em Seed Vac (Savant).

Antes da análise dos peptídeos por espectrometria de massas, peptídeos secos foram dissolvidos em solução de ácido fórmico a 1%. Análises de MS/MS foram realizadas em um espectrômetro de massas caracterizado por uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), dois analisadores de massas - um quadrupolo (Q) associado a um tubo no qual se mede o tempo de voo dos íons (TOF) e um detector de íons. Um sistema de cromatografia de líquida de ultra performace - UPLC (Waters, Milford, US) foi acoplado *on-line* ao ESI-Q-TOF. Os peptídeos foram separados em uma coluna capilar nano-C18 (75  $\mu\text{m}$  ID) por eluição com um gradiente de água-ACN contendo 0,1% de ácido fórmico. Dados foram adquiridos em modo de dados independentes (DDA) e íons de múltiplas cargas (+2 e +3) foram automaticamente selecionados e dissociados em experimentos MS/MS. Condições de ionização e cromatografia líquida foram: fluxo de 600 nL/min, voltagem do capilar de nanofluxo 3,5 kV, temperatura do bloco de 100 °C e voltagem do cone de 50 V.

Os espectros de massas adquiridos foram processados usando o software Mascot Distiller (Matrix Science, London, UK) e os arquivos MGF gerados foram consultados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando o software MASCOT v.2.2

(Matrix Science – [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) contra o banco de dados do NCBI. Buscas foram conduzidas com os seguintes critérios: tolerância de, no máximo, uma perda de clivagem para peptídeos semi-trípticos, carbamidometilação da cisteína, possível oxidação da metionina, tolerância do peptídeo de 0,2 Da e tolerância de MS/MS de 0.2 Da. O limite de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ . Buscas de homologia foram realizadas contra o banco de dados protéico do NCBI escolhendo “*Viridiplantae taxa*” como categoria taxonômica.

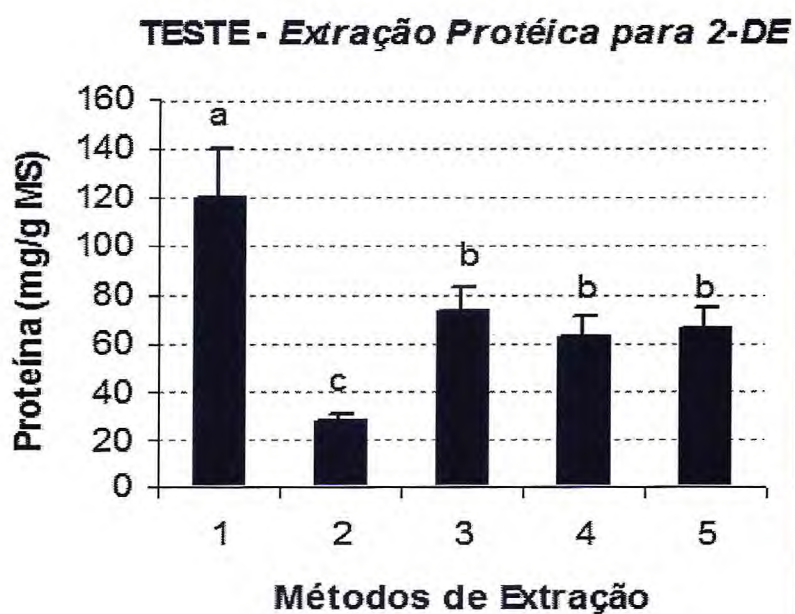
## 5 Resultados

### *5.1 Estabelecimento do protocolo de extração de proteínas do caule de cajueiro compatível com análise proteômica*

Além dos métodos descritos neste trabalho, outros protocolos, também, foram avaliados quanto à capacidade de extrair eficazmente as proteínas do caule do cajueiro, como a extração com ácido tricloacético (Damerval *et al.*, 1986) e o uso de diferentes tampões de extração. Porém, nenhum foi adequado.

O conteúdo de proteínas solúveis de caule de cajueiro variou bastante entre os diferentes métodos de extração descritos, sendo, em média, 119, 28, 74, 62 e 66 mg de proteína/g de massa seca, quando os métodos ‘1’, ‘2’, ‘3’, ‘4’ e ‘5’ foram, respectivamente, utilizados no processo de extração protéica (Fig 47). Apesar do método ‘1’ ter apresentado maiores teores de proteínas, nitidamente, o extrato protéico estava bastante contaminado com substâncias interferentes, já que a coloração do mesmo ficou amarronzada. Os demais extratos apresentaram leve pigmentação.





**Figura 47.** Teor de proteínas extraídas através dos diferentes métodos (descritos no texto) de preparação de caule de cajueiro para 2D-PAGE. Barras indicam desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias.

Com relação aos mapas bidimensionais, devido à grande presença de contaminantes no método '1' e ao baixo teor de proteínas extraídas pelos método '2', estes não foram

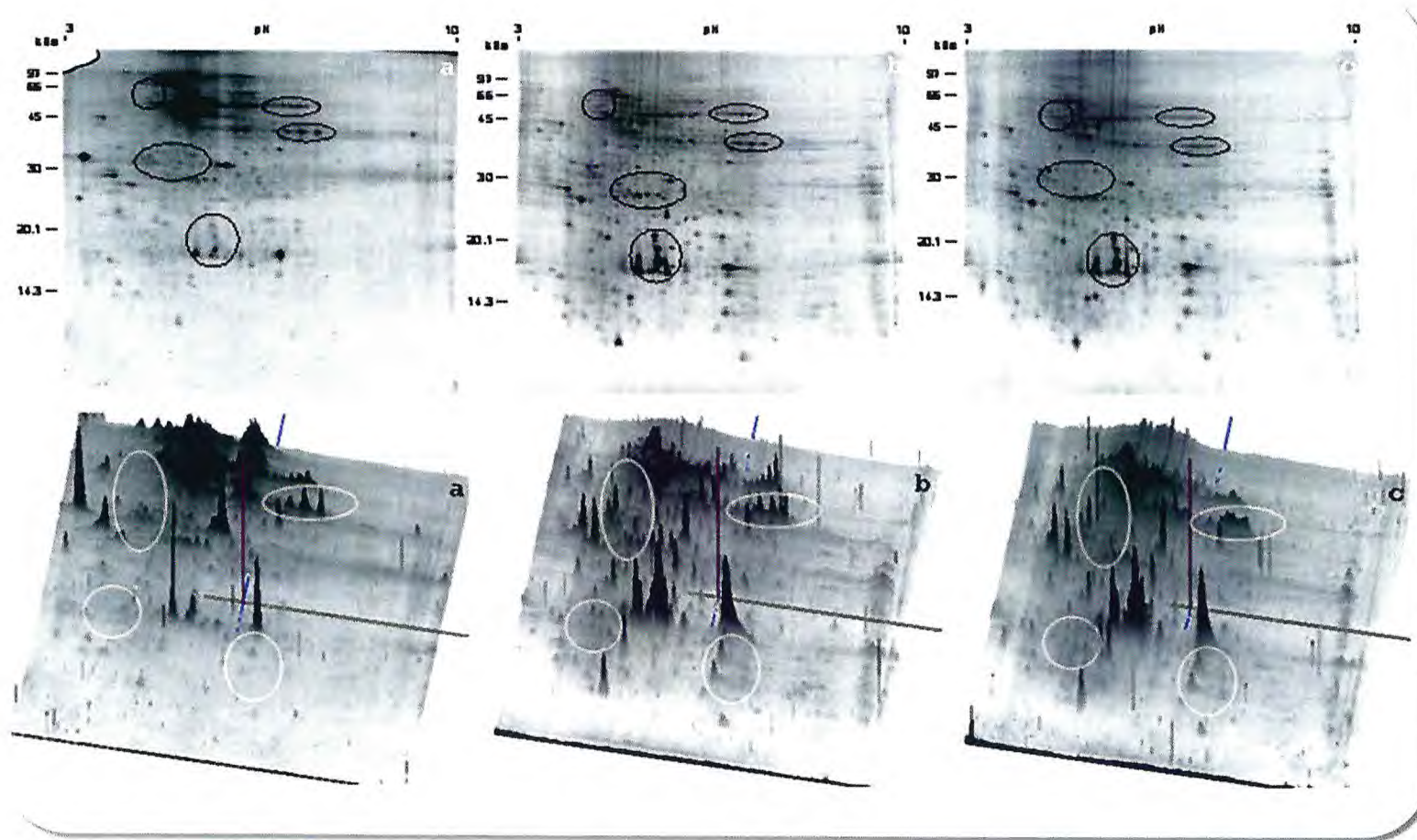
utilizados para realização da 2D-PAGE. Os perfis dos géis, em visão bidimensional e tridimensional, dos demais métodos mostraram mapas protéicos com diferentes padrões de *spots* protéicos (Fig 48). Usando o método '3' (Fig 48a) cerca de  $279 \pm 35$  spots foram detectados, enquanto no método '4' (Fig 48b) e '5' (Fig 48c),  $615 \pm 68$  e  $368 \pm 42$  spots foram detectados, respectivamente. As regiões circuladas das imagens dos géis demonstram diferenças qualitativas e quantitativas dos *spots*, comparando os três protocolos. O mapa obtido com o Extrato '3' tem poucas proteínas e apresenta arrastados horizontais e verticais, além de mais forte *background*. Diferentemente, um grande número de *spots* e melhor perfil protéico foi, claramente, obtido com os métodos '5' e, em especial, o '4'.

Para melhor caracterizar as diferenças entre os protocolos, o padrão de distribuição dos *spots* por ponto isoelétrico (pI) e massa molecular relativa (Mr) foi comparado (Fig 49). O Método '4' extraiu maior quantidade de proteínas em todas as categorias analisadas. Para finalizar, com o melhor método observado (método 4) foi realizada uma nova 2D-PAGE, usando tiras de focalização com gradiente de pH 4-7 linear na primeira dimensão. Neste gel (Fig 50), cerca de 580 *spots* foram detectados, com uma ótima resolução.

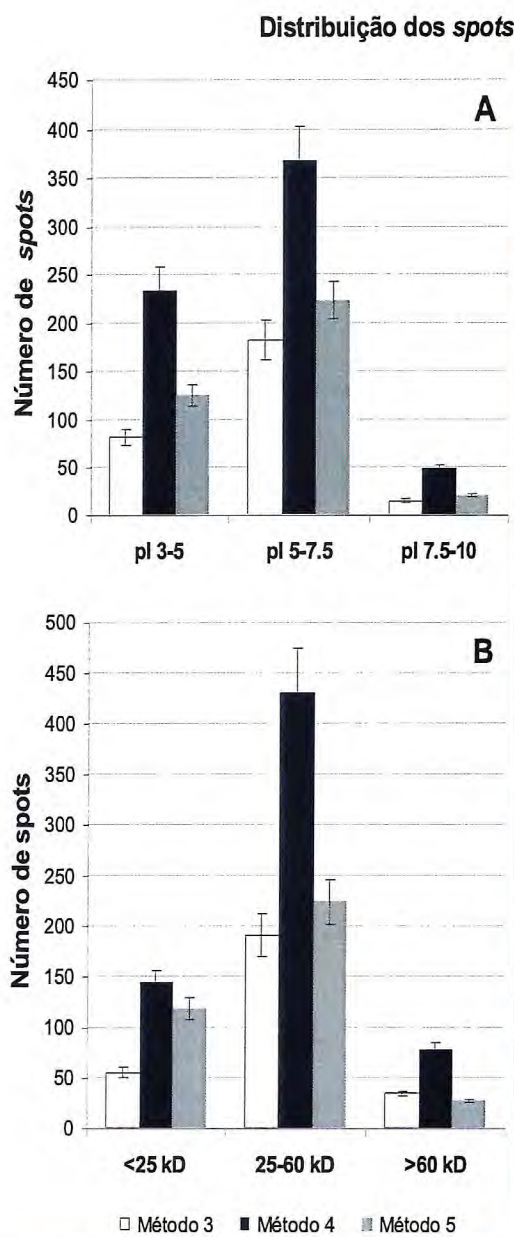
É importante ressaltar que, em um estudo proteômico, diferentes métodos de extração de proteínas podem ser utilizados para um mesmo tecido uma vez que seus perfis protéicos podem ser complementares. Mas, neste estudo, buscava-se determinar um único método que apresentasse maior cobertura de proteínas do caule de cajueiro.

Com relação ao teste para determinação da malha (%T) dos géis bidimensionais (Fig 51), foi observado que no gel a 12,5% vários *spots* de baixa massa molecular saíram do gel, juntamente com o indicador de corrida (azul de bromofenol), apesar de um bom perfil ter sido obtido. No gel a 15%, também, foi obtido um ótimo perfil protéico. Contudo, a separação das proteínas pela massa molecular foi inferior comparado com o gel a 14%, em especial, com relação aos *spots* de alta massa molecular. Portanto, as próximas etapas foram realizadas utilizando-se o método '4' de preparação das amostras e géis da segunda dimensão a 14%.



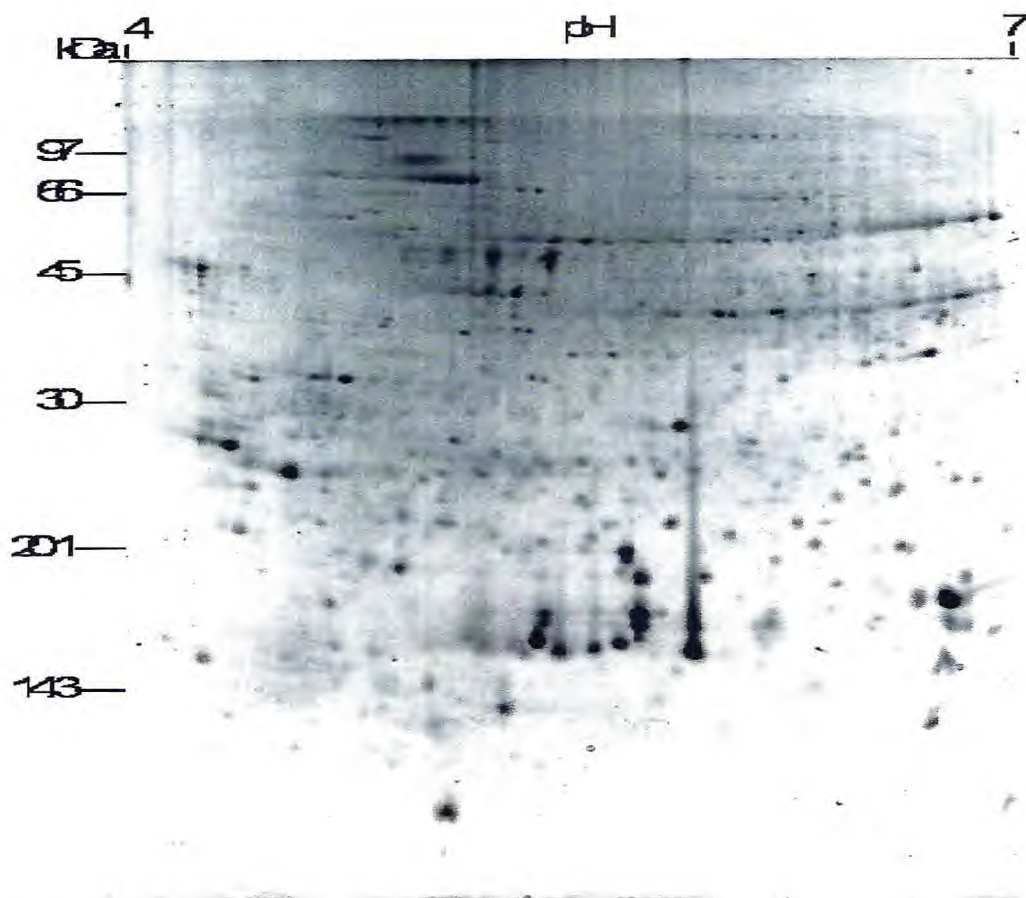


**Figura 48.** Comparação dos perfis de géis bidimensionais de proteínas do caule de cajueiro extraídas por diferentes métodos (descritos no texto). Visão bidimensional (acima) e tridimensional (abaixo) Em (a) Método 3; (b) Método 4; (c) Método 5. 300  $\mu$ g de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear e visualizadas após coramento com CBB coloidal. Algumas áreas foram circuladas nos géis para evidenciar regiões que demonstram diferenças quanto à intensidades e distribuição das proteínas por comparação dos diferentes métodos testados. Géis foram analisados pelo programa ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE-Healthcare).

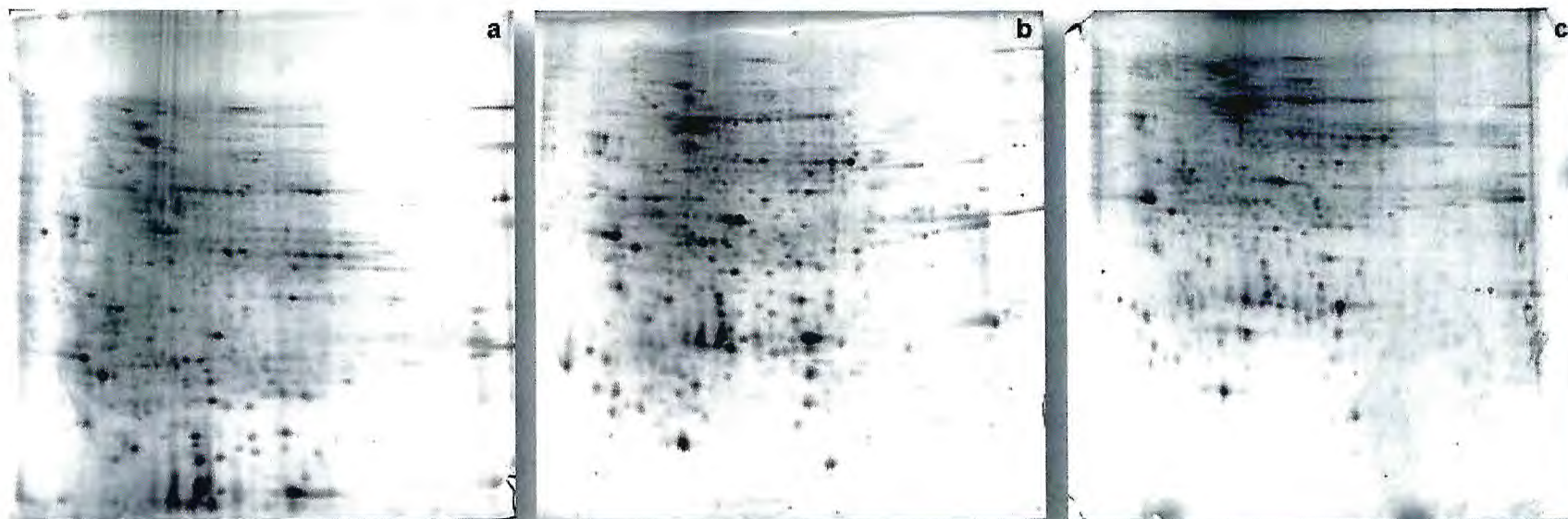


**Figura 49.** Distribuição por ponto isoelétrico (A) e massa molecular relativa (B) das proteínas do caule de cajueiro, após 2D-PAGE extraídas por diferentes métodos (descritos no texto). Método 3 (□), 4 (■) e 5 (▒). 300 µg de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear e visualizadas após coramento com CBB coloidal.





**Figura 50.** Gel bidimensional de proteínas do caule de cajueiro extraídas pelo Método 4 (descrito no texto). 300 µg de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 4-7 linear. Coloração por CBB coloidal.



**Figura 51.** Comparação do perfil de géis bidimensionais de proteínas do caule de cajueiro extraídas pelo método 4 (descrito no texto) e separadas em diferentes porcentagens de acrilamida (%T) do gel da segunda dimensão: (a) 12,5% (b) 14% e (c) 15%. 300 µg de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear. Coloração por CBB coloidal.

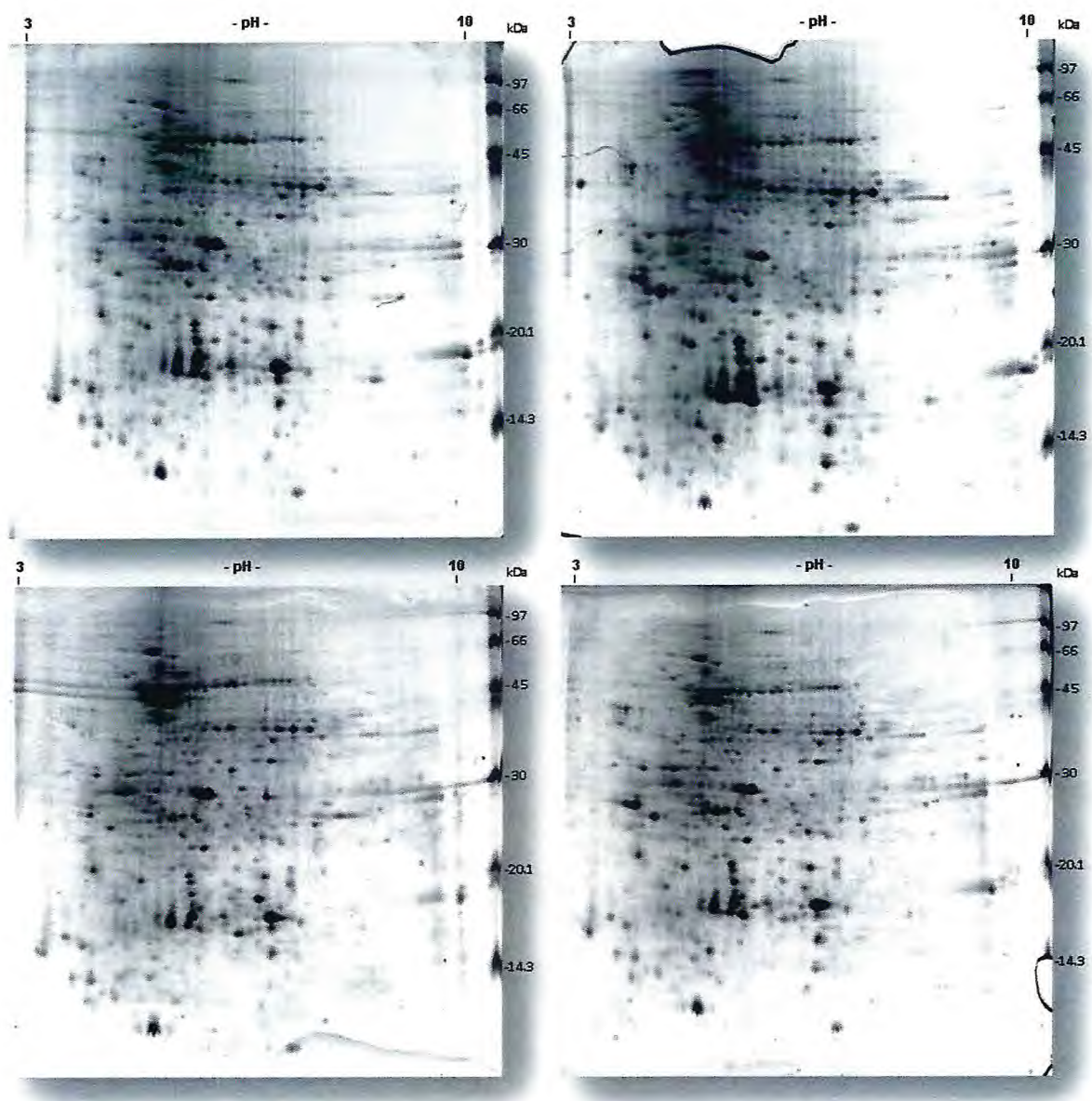


## **5.2 Análise proteômica em ramos de plantas adultas de cajueiro, clones CCP 76 e BRS 226, sadio e apresentando sintomas típicos da resinose**

Os caules de cajueiro coletados para análise proteômica foram processados (liofilizados e pulverizados) em pedaços contendo casca e cilindro central. A razão disto é que a doença em estudo exibe os sintomas visuais na casca dos ramos (escurecimento, inchaço e rachadura) e sob a casca, observa-se escurecimento dos tecidos mais internos que se estende até o câmbio vascular (Bezerra *et al.*, 2003).

Neste experimento, como já descrito, foi realizada análise proteômica comparativa entre os seguintes grupos: CCP 76 sem sintomas da resinose, CCP 76 apresentando sintomas da resinose, BRS 226 sem sintomas da resinose e BRS 226 apresentando sintomas da resinose.

Os perfis dos géis bidimensionais dos grupos estudados estão demonstrados na Fig. 52. Com relação ao número total de *spots*, foram revelados, em média: 268 *spots* para CCP 76 sadio; 291 *spots* para CCP 76 infectado; 308 *spots* para BRS 226 sadio; e 306 *spots* para BRS 226 infectado. Embora, não tenha havido grandes mudanças no número total de *spots*, notórias diferenças foram vistas entre os perfis protéicos de amostras sadias e infectadas, ao se comparar CCP 76 sadio x CCP 76 doente e BRS 226 sadio x BRS 226 doente. Para ambos os clones, as principais mudanças concentram-se na faixa de pI entre 4 e 6, nas mais variadas massa moleculares. Também, pela análise desses géis, foi observado que as diferenças entre as condições sadia e doente são mais evidentes no clone suscetível em relação ao resistente. No clone CCP 76, no mínimo, 29 *spots* tiveram sua intensidade aumentada e 8 *spots* a intensidade diminuída na condição doente, em relação à planta sadia. Já no clone resistente 18 *spots*, pelo menos, tiveram sua intensidade aumentada, enquanto, 5 *spots*, no mínimo, diminuíram sua intensidade.



**Figura 52.** Perfis dos géis bidimensionais de proteínas extraídas de ramos de cajueiro adulto, dos clones CCP 76 (acima) e BRS 226 (abaixo), nas condições sadio (a) e apresentando sintomas da resinose (b). 300  $\mu$ g de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear. SDS-PAGE 14%. Coloração por CBB coloidal.



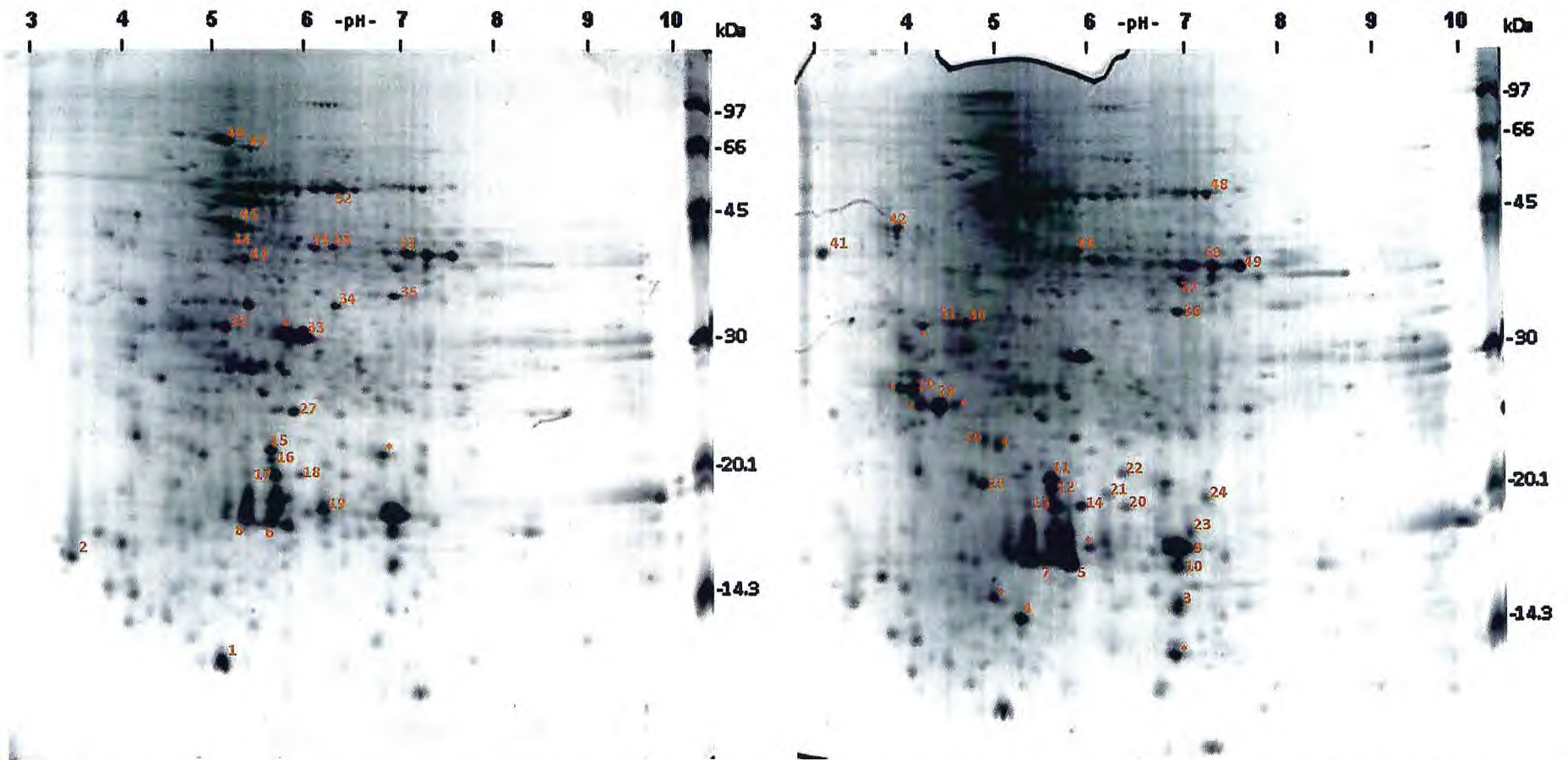
Diversos *spots*, diferencialmente expressos ou não, foram retirados dos géis para que as proteínas fossem identificadas. As Fig. 53 e 54 apresentam os *spots* selecionados que foram analisados por nano-UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. Vários *spots* localizados em pontos coincidentes de diferentes géis (por exemplo, 11=15, 12=16, 13=17 etc) foram, propositalmente, escolhidos a fim de confirmar a identidade destas proteínas.

Dentre os 94 *spots* selecionados para análise, 80 apresentaram similaridade com seqüências depositadas no banco de dados do NCBI. Porém, como já dito, alguns *spots* de números diferentes pertencem a regiões coincidentes nos diferentes géis, portanto representam o mesmo *spot*. Além disso, parte dos *spots* analisados apresentou similaridade com proteínas desconhecidas. Assim, no total, 59 diferentes *spots* foram identificados.

A identidade das proteínas, inclusive dos *spots* equivalentes retirados dos diferentes géis, está apresentada na Tabela 3. Constam, também, na tabela, a espécie vegetal pertencente à proteína similar, os valores de ponto isoelétrico e massa molecular (teóricos e experimentais), o score e a cobertura de seqüência de cada proteína identificada. Ainda, na tabela, está indicado se a proteína foi diferencialmente expressa e em quais géis.

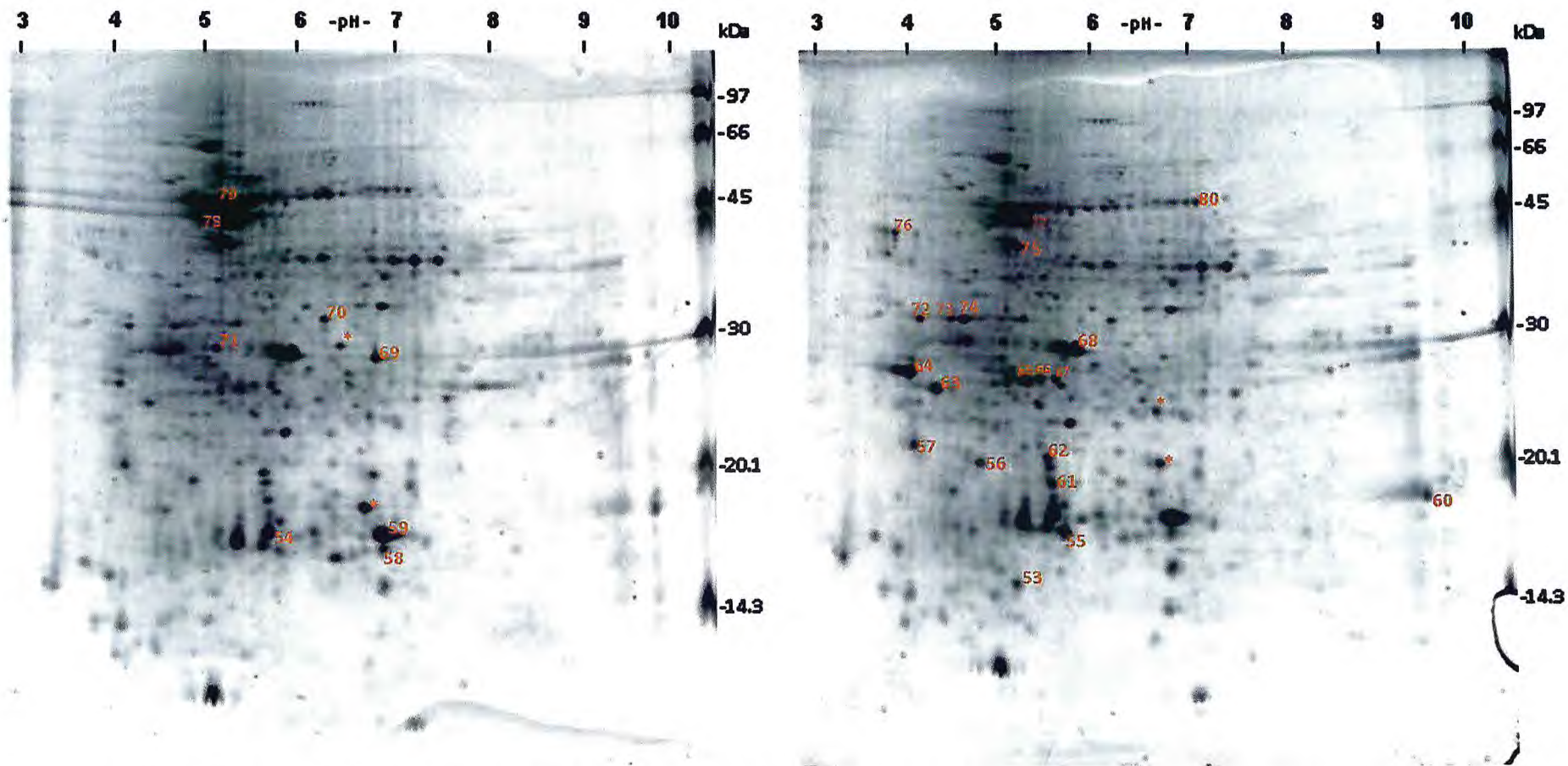
Quanto à identificação geral das proteínas, vale destacar a presença de um forte grupo de proteínas de resposta a estresse conhecidas como '*heat shock*' que somaram 14 diferentes spots (5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 22, 24, 26 e 54), localizados na faixa de pI entre 5,3 e 7,0 e Mr entre 17 e 23 kDa. Também, várias proteínas (9 diferentes *spots*) envolvidas com a regulação de ROS foram identificadas, tais como, dismutase do superóxido, ascorbato peroxidase, peroxidase e catalase. Outras proteínas envolvidas com respostas a estresses bióticos e abióticos, também, foram identificadas. Estas incluem a  $\beta$ -1,3-glucanase, uma proteína de resposta ao ácido abscísico e a enzima isoflavona redutase. As demais proteínas identificadas, como já dito, constam na Tabela 3.

Com relação às proteínas identificadas e diferencialmente expressas, vale ressaltar que, no clone CCP 76, várias proteínas de resposta à estresse tiveram sua expressão aumentada: superóxido dismutase, peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e algumas proteínas *heat-shock*. Com relação ao clone BRS 226, também, algumas proteínas com papel de defesa vegetal foram alteradas: isoflavona redutase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e proteína *heat-shock*. Outras proteínas não citadas estão indicadas na Tabela 3.



**Figura 53.** Indicação dos spots submetidos à análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF retirados dos géis bidimensionais de ramos de cajueiro adultos clone CCP 76, nas condições sadio (esquerda) e apresentando sintomas da resinose (direita). Os números indicam os *spots* que apresentaram similaridade com seqüências depositadas no banco de dados (NCBI) e os asteriscos os *spot* não identificados. 300 µg de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear. SDS-PAGE 14%. Coloração por CBB coloidal.





**Figura 54.** Indicação dos spots submetidos à análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF retirados dos géis bidimensionais de ramos de cajueiro adulto clone BRS 226, nas condições sadio (esquerda) e apresentando sintomas da resinose (direita). Os números indicam os *spots* que apresentaram similaridade com seqüências depositadas no banco de dados (NCBI) e os asteriscos os *spot* não identificados. 300 µg de proteínas foram separadas por IEF em tiras de focalização de 13 cm, pH 3-10 linear. SDS-PAGE 14%. Coloração por CBB coloidal.

**Tabela 3.** Identificação das proteínas do caule de cajueiro anão precoce adulto, através de análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF e ferramentas de bioinformática.

Nº do spot	Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/Mr (kDa)		Score <sup>(a)</sup>	Cobertura da sequência (%)	Diferencial mente expressa	Geis <sup>(b)</sup>
				Experimental	Teórico				
1	gi 224123436	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	5.12/11.7	5.83/21.1	73	6		
2	gi 16225	calmodulin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3.45/15.5	4.20/15.6	271	39		
3	gi 71040669	nucleoside diphosphate kinase I	<i>Arachis hypogaea</i>	6.96/15.2	6.30/16.4	201	26		
4	gi 224123436	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	5.31/14.4	5.83/21.1	74	6	×	↑CP76 doente
5	gi 13274150	superoxide dismutase	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	5.87/16.8	5.47/15.3	50	7		
6	gi 123550	heat shock protein	<i>Pisum sativum</i>	5.68/15.4	6.32/17.0	130	21		
7	gi 1350520	heat shock protein	<i>Picea glauca</i>	5.62/17.0	5.54/17.0	70	15		
8	gi 1350520	heat shock protein	<i>Picea glauca</i>	5.36/17.0	5.54/16.9	114	15		
9	gi 38639431	heat shock protein	<i>Carica papaya</i>	6.95/17.2	5.31/17.4	27	25		
10	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	6.95/16.6	5.34/17.5	265	27		
11	gi 255558876	heat-shock protein	<i>Ricinus communis</i>	5.62/20.2	5.34/17.5	102	19	×	↑CP76 doente
12	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	5.63/19.7	5.34/17.5	149	19	×	↑CP76 doente
13	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	5.67/18.8	5.34/17.5	120	13		
14	gi 123534	heat shock protein	<i>Glycine max</i>	5.94/18.9	6.17/17.3	131	19	×	↑CP76 doente
15	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	5.7//19.0	5.34/17.5	129	13		



16	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	5.70/18.6	5.34/17.5	79	9		
17	gi 123534	heat shock protein	<i>Glycine max</i>	5.75/17.9	6.17/17.3	98	19		
18	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	5.34/17.0	5.34/17.5	207	29		
19	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	6.18/17.6	5.34/17.5	178	24		
20*	gi 205830697	Unknown protein	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	6.42/19.3	5.80/1.3	49	91		
21	gi 255558876	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	6.22/19.8	5.34/17.5	85	19		
22	gi 255557799	heat shock protein	<i>Ricinus communis</i>	6.39/21.1	6.21/22.1	103	12		
23	gi 118162023	CBS domain-containing protein	<i>Solenostemon scutellarioides</i>	7.90/17.8	9.24/22.2	160	13		
24	gi 255560519	heat-shock protein	<i>Ricinus communis</i>	7.25/19.3	6.45/21.7	71	10		
25*	gi 205830697	Unknown protein	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	4.91/20.0	5.80/1.3	50	91	×	↑CP76 doente
26	gi 156711718	heat shock protein	<i>Rhododendron breviperculatum</i>	4.93/22.8	4.84/12.8	46	7		
27	gi 161778782	superoxide dismutase	<i>Vitis vinifera</i>	5.87/23.4	6.79/25.3	143	16		
28	gi 1222992	proteasome subunit alpha type-5	<i>Glycine max</i>	4.46/24.9	4.70/26.1	89	18	×	↑CP76 doente
29	gi 159462486	predicted protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4.18/26.2	8.61/36.6	42	2	×	↑CP76 doente
30	gi 87042321	beta-1,3-glucanase	<i>Mangifera indica</i>	4.75/31.8	5.77/19.5	46	6	×	↑CP76 doente
31	gi 87042321	beta-1,3-glucanase	<i>Mangifera indica</i>	4.62/31.9	5.77/19.5	148	13	×	↑CP76 doente
32	gi 12644171	Oxygen-evolving enhancer protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	5.13/30.6	5.91/35.1	363	30		
33	gi 16660407	Abscisic acid response protein	<i>Cucumis melo</i>	5.98/29.9	6.22/12.8	95	18	×	↓CP76 doente
34	gi 15234993	isoflavone reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.33/32.8	6.33/34.2	111	3	×	↓CP76 doente
35	gi 3243234	isoflavone reductase	<i>Pyrus communis</i>	6.96/32.9	6.02/33.8	178	11		
36	gi 15234993	isoflavone reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.74/32.9	6.33/34.2	79	11	×	↑BR226 doente

37	gi 21388550	NAD-dependent malate dehydrogenase	<i>Solanum tuberosum</i>	7.01/36.0	8.48/36.4	175	12		
38	gi 209529862	glutamine synthetase	<i>Solanum tuberosum</i>	6.29/38.3	5.29/38.7	85	8		
39	gi 45738588	NADH dehydrogenase subunit F	<i>Sowerbaea juncea</i>	6.10/38.2	9.20/55.9	78	28		
40	gi 121485004	phosphoglycerate kinase	<i>Helianthus annuus</i>	5.92/39.4	5.82/42.3	446	29		
41	gi 84579412	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 4	<i>Lactuca sativa</i>	3.23/39.3	7.65/64.5	43	1		
42 <sup>#</sup>	PERA2_ARMRU	Peroxidase	<i>Armoracia rusticana</i>	4.25/42.2	4.72/32.3	38	2	×	↑CP76 doente
43	gi 255577879	alcohol dehydrogenase	<i>Ricinus communis</i>	5.33/38.0	5.59/39.0	79	13		
44	gi 32186890	actin	<i>Gossypium hirsutum</i>	5.30/41.8	5.30/41.9	295	27		
45	gi 225444485	hypothetical protein (superfamily Dioxygenase)	<i>Vitis vinifera</i>	5.37/32.8	5.50/33.2	354	29	×	↓CP76 doente
46	gi 195647418	shock cognate protein 2	<i>Zea mays</i>	5.16/61.3	5.13/71.5	65	5	×	↑CP76 doente
47	gi 137460	V-type proton ATPase catalytic subunit A	<i>Daucus carota</i>	5.40/58.8	5.29/69.0	177	8	×	↑CP76 doente
48	gi 1705615	Catalase	<i>Hordeum vulgare</i>	7.28/47.5	6.60/57.3	160	6	×	↑CP76 doente
49	gi 74475508	glyceraldehyde-3-dehydrogenase C subunit	<i>Glycine max</i>	7.61/37.5	6.72/36.8	348	21		
50	gi 120676	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Nicotiana tabacum</i>	7.33/37.6	6.14/35.6	135	7		
51	gi 120668	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Hordeum vulgare</i>	7.11/37.7	6.20/33.4	119	9	×	↑CP76doente
52	gi 45935397	ruBisCO large subunit	<i>Anacardium occidentale</i>	6.39/49.5	7.20/52.1	305	21	×	↓CP76 doente
53	gi 224123436	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	5.31/14.4	5.83/21.1	74	6	×	↑BR226 doente
54	gi 4836473	heat shock protein	<i>Lycopersicon esculentum</i>	5.79/16.7	5.84/17.6	192	25		↑BR226 doente
55	gi 13274150	superoxide dismutase	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	5.87/16.8	5.47/15.3	50	7	×	↑CP76doente ↑BR226doente
56	gi 115476908	hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	4.91/19.7	5.19/19.7	64	10		



57	gi 587546	translationally-controlled tumor protein homolog	<i>Solanum tuberosum</i>	4.15/20.8	4.54/18.8	76	10	×	↓BR226 Doente
58	gi 4836473	heat shock protein	<i>Lycopersicon esculentum</i>	7.04/16.1	5.84/17.6	130	29		
59	gi 147865768	hypothetical protein	<i>Vitis vinifera</i>	7.07/17.3	7.49/21.0	43	3		
60	gi 829119	Cyclophilin	<i>Phaseolus vulgaris</i>	9.90/18.3	8.36/18.3	99	16		
61	gi 123534	heat shock protein	<i>Glycine max</i>	5.72/18.8	6.17/17.3	94	19	×	↑BR226 doente
62	gi 70672850	seed storage protein A	<i>Vigna luteola</i>	6.68/20.0	5.09/49.8	109	8		
63	gi 12229923	proteasome subunit alpha type-5	<i>Glycine max</i>	4.42/24.5	4.70/26.1	132	14	×	↑BR226 doente
64	gi 159462486	predicted protein	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4.18/26.2	8.61/36.6	42	2	×	↑BR226 doente
65	gi 145307760	ascorbate peroxidase	<i>Litchi chinensis</i>	5.46/25.2	4.80/23.3	132	26		
66	gi 46911557	ascorbate peroxidase	<i>Nicotiana tabacum</i>	5.58/25.3	5.43/27.6	98	11	×	↑BR226 doente
67	gi 468733	ascorbate peroxidase	<i>Raphanus sativus</i>	5.77/25.2	5.48/27.9	150	12		
68	gi 16660407	abscisic acid response protein	<i>Cucumis melo</i>	5.98/29.9	6.22/12.8	95	18		
69	gi 1000708	Albumin	<i>Vigna radiata var. radiata</i>	6.96/27.2	6.89/30	68	7	×	↓BR226Doente
70	gi 3243234	isoflavone reductase	<i>Pyrus communis</i>	6.40/30.6	6.02/33.	85	6		
71	gi 131385	Oxygen-evolving enhancer protein 1	<i>Solanum tuberosum</i>	5.22/28.0	5.84/35.5	278	27		
72	gi 255540271	elongation factor 1-beta	<i>Ricinus communis</i>	4.24/30.4	4.45/25.1	83	7	×	↑BR226 doente
73	gi 87042321	beta-1,3-glucanase	<i>Mangifera indica</i>	4.60/30.5	5.77/19.5	60	13	×	↑BR226 doente
74	gi 87042321	beta-1,3-glucanase	<i>Mangifera indica</i>	4.75/30.3	5.77/19.5	154	27	×	↑BR226 doente
75	gi 32186890	Actin	<i>Gossypium hirsutum</i>	5.35/38.6	5.31/41.9	477	34		
76 <sup>#</sup>	PERA2_ARMRU	Peroxidase	<i>Armoracia laphatifolia</i>	3.95/40.5	4.72/32.3	40	2		
77	gi 160332746	Vicilin	<i>Vigna unguiculata</i>	5.51/41.5	5.35/49.6	545	30	×	↑BR226 doente

<b>78</b>	gi 160332746	Vicilin	<i>Vigna unguiculata</i>	5.28/41.6	5.35/49.6	698	39	×	↑BR226 doente
<b>79</b>	gi 70672850	seed storage protein A	<i>Vigna luteola</i>	5.36/43.9	5.09/49.8	425	18		
<b>80</b>	gi 46242868	rubisco large subunit	<i>Brucea javanica</i>	6.45/45.6	6.09/53.1	269	18		

(a) Todos os valores de escores listados estão acima do escore limite, calculado pelo Mascot, e indicam extensa similaridade ( $p < 0.05$ ) nas buscas pelo NCBI.

(b) Nesta coluna está indicado em qual gel ocorreu a expressão diferencial do *spot* (quando for o caso). A comparação foi realizada entre os pares: CCP 76 sadio x CCP 76 doente e BRS 226 sadio x BRS 226 doente. ↑ = aumento; ↓ = diminuição.

\* Os *spots* 20 e 25 apresentaram uma alta seqüência de cobertura (91%) porque, no banco de dados (NCBI) está depositado apenas um pequeno peptídeos desta proteína.

# Estes dois *spots* (42 e 76) foram identificados através do banco de dados MSDB.



## 6 Discussão

Para a realização de estudos proteômicos, através da separação de proteínas por meio da 2D-PAGE e, subsequente, identificação por MS, uma etapa inicial e fundamental é o estabelecimento de um protocolo de extração de proteínas seguindo alguns critérios como: maior rendimento, solubilização e baixa contaminação da amostra com outros compostos. Cinco procedimentos de extração foram testados com o objetivo de avaliar suas aplicabilidades e performances para extração de proteínas do caule do cajueiro, seguindo os critérios citados.

O método '4' de extração de proteínas do caule de cajueiro possibilitou uma ótima eficácia na extração de proteínas e permitiu a obtenção de excelentes géis bidimensionais com ótima resolução dos *spots* e mínimo *background* (Fig 48). O ótimo desempenho deste método, em relação aos demais testados, foi confirmado pela maior distribuição das proteínas extraídas por várias faixas de *pI* e massa molecular (Fig 49). O fraco perfil apresentado pelo método 3, comparado com os métodos '4' e '5', demonstra a necessidade de remoção das substâncias interferentes antes da etapa de extração propriamente dita, com o tampão escolhido. Essa lavagem foi feita em ambos os métodos '4' e '5', com soluções à base de acetona ou metanol. Já o melhor desempenho do método '4' em relação ao '5' pode ser devido à solubilidade diferencial das proteínas do caule de cajueiro, uma vez que esses protocolos diferem com relação ao pH do tampão de extração e soluções de lavagem.

Os resultados apresentados reforçam a alta eficiência e capacidade de limpeza do reagente de fenol na produção de extratos protéicos. Isso ocorre devido à melhor solubilização das proteínas, redução das interações entre proteínas e compostos interferentes e baixa solubilidade dos polissacarídeos e ácidos nucleicos neste reagente (Carpentier *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2006). Além disso, a pré-lavagem das amostras vegetais com solução de acetona remove parte das substâncias interferentes (fenóis e lipídios), desfaz interações entre lipídios e proteínas, e enfraquece o tecido vegetal, aumentando sua superfície de contato com o tampão de extração (Shaw *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2006). Consequentemente, a lavagem com acetona aumenta a qualidade e eficiência na extração das proteínas dos tecidos vegetais.

Uma vez estabelecido o método de extração protéica para tecidos do caule de cajueiro, um estudo proteômico comparativo do caule dos clones contrastantes, CCP 76 e BRS 226, em condições sadio e infectados pelo *L.theobromae*, foi realizado.



Os géis bidimensionais com proteínas extraídas dos ramos de cajueiro adulto, coletado no campo, apresentaram excelentes perfis protéicos, contendo um bom número de *spots* com boa definição. Diversos *spots* foram recortados dos géis 2D-PAGE para a identificação das proteínas. Uma atenção especial foi dada aos *spots* que tiveram sua expressão diferenciada. Contudo, vários outros *spots* foram submetidos à análise para que um maior número de proteínas do caule de cajueiro fossem identificadas, a fim de agregar informações para o cajueiro.

Cinquenta e nove diferentes *spots* foram identificados. Cerca de metade (31 *spots*) das proteínas identificadas estão relacionadas com respostas à estresse: superóxido dismutase, proteínas heat shock,  $\beta$ -1,3-glucanase, isoflavona redutase, peroxidases, catalases, ascorbato peroxidase, além de outras. Dentre essas, 27% foram proteínas *heat-shock*. Este resultado está de acordo com a excelente adaptação do cajueiro às condições do semi-árido nordestino. Esta informação é aplicável, principalmente, para os clones CCP 76 e BRS 226, uma vez que ambos têm excelente produtividade neste clima adverso (Paiva et al., 2002; 2008).

Diversas proteínas tiveram sua expressão alterada quando as condições sadia e doente dos ramos de cada clone foram comparadas. Algumas delas puderam ser identificadas. Em ambos os clones estudados, houve superexpressão de proteínas relacionadas à defesa vegetal quando ocorreu o ataque do *L. theobromae*. Dentre estas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a  $\beta$ -1,3-glucanase (GLU), as peroxidases do guaiacol e do ascorbato (POX e APX, respectivamente) e as proteínas *heat shock* (HSPs) (Tabela 3).

Em vários sistemas planta-patógenos, um dos primeiros eventos induzidos após a planta reconhecer a presença do patógeno é a chamada explosão oxidativa (Apel e Hirt, 2004), durante a qual há rápida geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentre outros eventos bioquímicos. Este aumento de ROS ocorre no sítio de tentativa de infecção pelo patógeno, resultando na morte programada celular (PCD) (Heil e Bostock, 2002). Uma fina regulação destas ROS é muitas vezes determinante para o sucesso ou bloqueio da infecção do patógeno. Isto irá depender da magnitude e rapidez das respostas vegetais, assim como, do hábito de vida do patógeno, se biotrófico, hemibiotrófico ou necrotrófico. Diversos trabalhos têm correlacionado o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, com maior resistência aos estresses bióticos e abióticos (Sasabe et al., 2000; Mayer et al., 2001). No patossistema cajueiro x *L. theobromae*, houve aumento de expressão de duas enzimas de ação oxidante em plantas atacadas pelo patógeno: SOD e APX.



As POXs são enzimas constantemente estudadas em interações planta-patógeno, devido à sua participação em eventos relacionados ao reforço da parede celular, como a lignificação, em oposição à entrada de patógenos (Van Loon e Van strien, 1999). O aumento da atividade dessa enzima em tecidos vegetais pode ocorrer em decorrência do contato com patógeno, agressões mecânicas e tratamento químico (Fernandes, 2004; Van Loon *et al.*, 2006; Gondim *et al.*, 2008). Este trabalho observou uma expressão diferenciada de POX em caule de cajueiro infectado com *L. theobromae*.

A  $\beta$ -1,3-glucanase tem propriedades antifúngicas devido à sua capacidade de clivar  $\beta$ -1,3-glucanos, componentes abundantes da parede celular dos fungos. O aumento dessa enzima, demonstrado pela superexpressão de dois spots identificados como GLU, ocorreu em plantas doentes, de ambos os clones na tentativa do cajueiro, muito provavelmente, conter a invasão do *L. theobromae*. É esperado o aumento desta enzima em interações planta-fungo e muitos trabalhos demonstram isto (Vogeli-Lange *et al.*, 1988; Sticher *et al.*, 1997; Cota *et al.*, 2007).

Varias HSPs tiveram sua expressão aumentada nos ramos doentes de ambos os clones. Estas proteínas funcionam como chaperonas moleculares, ligando-se a sítios de reconhecimento de proteínas dobradas ou desnaturadas, a fim de evitar agregação irreversível e permitir dobramento correto (Landry e Gierasch, 1994). Nas amostras de ramos de cajueiro foram detectadas HSPs de baixa massa molecular, as sHSPs (*small heat shock proteins*). Estas proteínas formam uma classe de chaperonas, que possuem massa molecular entre 20 e 30 kDa e compartilham um domínio conservado de 100 aminoácidos. A diversidade de sHSPs é observada somente em plantas e reflete a intensa adaptação das plantas a diferentes condições de estresse (Meireles, 2006). Ataque de patógenos e os mais variados estresses abióticos são capazes de elevar a expressão dessas proteínas, que exercem um papel protetor nas células afetadas (Ventelon-Debout *et al.*, 2004; Timperio *et al.*, 2008).

Embora a análise proteômica do material do campo tenha iniciado a caracterização das respostas de defesa do cajueiro à infecção pelo *L. theobromae*, não foi possível se detectar respostas diferenciais entre os clones CCP 76 e BRS 226. Provavelmente, isto ocorreu devido ao estágio avançado que a doença se encontrava no material analisado, uma vez que já é bem sabido que uma resposta de defesa vegetal eficaz tem relação não só com a intensidade da resposta, mas, também, com o tempo de ativação das defesas. Portanto, nesse estudo, não foi possível correlacionar maior expressão de proteínas específicas com a característica de resistência do clone BRS 226.

## 6 Considerações finais

Para compreender os eventos ligados à resistência vegetal, uma etapa básica é a identificação das proteínas expressas durante a interação da planta com seu inimigo, para, a partir daí, se determinar quais delas conferem resistência ou patogenicidade e os mecanismos envolvidos nestes eventos (Mehta et al., 2008). Para isto, a busca por um método de extração protéico que permita a elaboração de mapas bidimensionais de alta qualidade é extremamente valiosa. Neste trabalho este desafio foi vencido. O caule de cajueiro não é uma fonte de pronta disponibilidade de proteínas e requer cuidados específicos. Esse trabalho apresenta, pela primeira vez, um protocolo eficaz para a extração de proteínas para uso em proteômica de caule do cajueiro, um tecido vegetal altamente recalcitrante.

Também, um primeiro estudo proteômico comparativo foi realizado entre clones de cajueiro anão suscetível e resistente à resinose. Diversas proteínas, típicas de respostas de defesa, foram identificadas, tanto no clone suscetível quanto no resistente, não sendo possível correlacionar algumas proteínas identificadas com características de resistência e suscetibilidade. Este fato não é surpreendente uma vez que o material investigado foi caule de planta adulta já apresentando sintomas típicos da resinose. Por isso, novos experimentos precisam ser elaborados com plantas jovens e recém-infectadas para que se possa avaliar as reações de defesa do cajueiro no início da infecção do *L. theobromae*.

Torna-se evidente, a partir desse estudo inicial, a necessidade de progredir no refinamento das tecnologias proteômicas, a fim de se identificar um maior número de proteínas, em especial, àquelas diferencialmente expressas entre plantas sadias e infectadas pelo *L. theobromae*. Futuramente, isto permitirá a identificação de marcadores protéicos de resistência do cajueiro à resinose, o desenvolvimento de formas mais eficientes de controle desta doença, o direcionamento de programas de melhoramento genético do cajueiro no quesito resistência à resinose, além de aprofundar os conhecimentos com relação à bioquímica (de proteínas) desta espécie vegetal de grande importância para o nordeste brasileiro.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.I.L., ARAÚJO, F.E., LOPES, J.G.V. **Evolução do cajueiro anão precoce na Estação Experimental de Pacajus, Ceará.** Fortaleza, EPACE, 1993. 17p. (EPACE, Documentos, 6).

AMAKO, K., CHEN, G.-X., ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiology**, 35, 497–504, 1994.

ANDERSON, M. D. PRASAD, T. K. STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109, 1247-1 257, 1995.

ANDRADE, A. **Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de *Eucalyptus grandis*.** 2006. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba – SP.

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

ARAÚJO-FILHO, J.E. **Análise proteômica de raízes de cowpea (*Vigna unguiculata*), CV. CE-31, inoculadas com o nematóide das galhas (*Meloydogine incognita*).** 2010. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.

BAIRD, R., CARLING, D. Survival of parasitic anal saprophytic fungi or intact senescent cotton roots. **Journal of Cotton Science**, 2, 27–34, 1998.

BANERJEE, J., DAS, N., DEY, P., MAITI, M.K. Transgenically expressed rice germin-like protein1 in tobacco causes hyper-accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reinforcement of the cell wall components. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 402(4), 637-643, 2010.

BARROS, L.M., PAIVA, J.R., CAVALCANTI, J.J.V. Cajueiro anão precoce. **Revista Biotecnologia**, 2(6), 18-21, 1998.

BARROS, L.M., PIMENTEL, C.R.M., CORREA, M.P.F., MESQUITA, A.L.M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce.** Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 1993. 65p. (EMBRAPA-CNPAT. Circular Técnica, 1).

BAYSAL, O., TURGUT, C., MAO, G. Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. **Biologia Plantarum**, 49(4), 599-604, 2005.

BAYSAL, O., ZELLER, W. Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to acibenzolar-S-methyl against fire blight (*Erwinia amylovora*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 65(6), 305-315, 2004.

BEZERRA, M.A., CARDOSO, J.E., SANTOS, A.A., VIDAL, J.C., ALNECAR, E.S. **Efeito da resinosidade na fotossíntese do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 8), 2003.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases. In: **Molecular Plant Pathology**. Edited by S.J. GURR, M. J. McPHERSON, and D. J. BOWLES, IRL Press, New York, p. 23-29, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BRITTON, K.O., HENDRIX, F.F. Population dynamics of *Botryosphaeria spp.* in peach gummosis canker. **Plant Disease**, 70, 134-136, 1986.

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Editora American Society of Plant Physiologists. Rockville USA, 2000. 1367p.

CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L. *et al.* Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, 25, 1327-1333, 2004.

CANTÚ, M.D. **Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros**. 2007. 229f. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos – SP.

CANTÚ, M.D., CARRILHO, E., WULFF, N.A., PALMA, M.S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, 31(3), 669-675, 2008.

CANTÚ, M.D.; MARIANO, A.G.; PALMA, M.S.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A. Proteomic analysis reveals suppression of bark chitinases and proteinase inhibitors in citrus plants affected by the citrus sudden death disease. **Phytopathology**, 98, 1084-1092, 2008.

CAO, T., SRIVASTAVA, S., RAHMAN, M.H., KAV, N. N.V.M., HOTTE, N., DEYHOLOS, M.K., STRELKOV, S.E. Proteome-level changes in roots of *Brassica napus* as a result of *Plasmodiophora brassica* infection. **Plant Science**, 174, 97-115, 2008.

CARDOSO, J.E., CAVALCANTI, J.J.V., CYSNE, A.Q., SOUSA, T.R.M., CORRÊA, M.C.M. Interação enxerto e porta-enxerto na incidência da resinosidade do cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 32(3), 847-854, 2010.



CARDOSO, J.E., BEZERRA, M.A., VIANA, F.M.P., SOUSA, T.R.M., CYSNE, A.Q., FARIAS, F.C. Ocorrência endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* em tecidos de cajueiro e sua transmissão por propágulos. **Summa phytopathologica**, 35(4), 262-266, 2009.

CARDOSO, J.E., FREIRE, F.C.O., SÁ, F.T., SOUZA, R.N.M. **Disseminação e controle da resinose em troncos de cajueiro decepados para substituição de copas**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 4p. (Comunicado Técnico, 17), 1998.

CARDOSO, J.E., SANTOS, A.A., ROSSETTI, A.G., VIDAL, J.C. Relationship between incidence and severity of gummosis in semiarid north-eastern Brazil. **Plant Pathology**, 53, 363-367, 2004.

CARDOSO, J.E., PAIVA J.R., CAVALCANTI J.J.V., SANTOS A.A., VIDAL, J.C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, 25, 855-859, 2006.

CARDOSO, J.E., VIANNA, F.M.P., CYSNE, A.Q., FARIAS, F.C., SOUZA, R.N.M. **Clone Embrapa 51: uma alternativa para resistência à resinose-do-cajueiro**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 3p. (Comunicado Técnico, 130), 2007.

CARPENTIER, S.C., PANIS, B., VERTOMMEN, A., SWENNEN, R., *et al.* Proteome analysis of non-model plants: a challenging but powerful approach. **Mass Spectrometry Review**, 27, 354-377, 2008.

CARPENTIER, S.C., WITTERS, E., LAUKENS, K., DECKERS, P., *et al.* Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, 5, 2497-2507, 2005.

CASTILLEJO, M.A., AMIOUR, N., DUMAS-GAUDOT, E., RUBIALES, D., JORRÍN, J.V. A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). **Phytochemistry**, 65, 1817-1828, 2004.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., LIMA, J.P.M.S., SILVEIRA, J.A.G., OLIVEIRA, J.T.A. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 68, 198-208, 2006.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., CARVALHO, C.P.S., SILVEIRA, J.A.G., OLIVEIRA, J.T.A. An aqueous suspension of *Crinipellis perniciosus* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, 26, 729-738, 2007.

CAVALCANTI, F.R., RESENDE, M.L.V., PEREIRA, R.B., COSTA, J.C.B., CARVALHO, C.P.S. Atividades de quitinase e b-1,3-glucanase após elicitação das defesas do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(12), 1721-1730, 2006.

CHEN, S., HARMON, A.L. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, 6, 5504-5516, 2006.

CHEN, Z., SILVA, H., KLESSIG, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, 262(10), 1883-1886, 1993.

CILLIERS, A.J., SWART, W.J., WINGFIELD, M.J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **South African Forest Journal**, 166, 47-52, 1993.

CLARKE, S.F., GUY, P.L., BURRITT, D.J., JAMESON, P.E. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. **Physiologia Plantarum**, 114, 157-164, 2002.

CORDEIRO, M.C.R., SÁ, M.F.G. Biotecnologia e Resistência à Patógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Embrapa-Cenargen Brasília, DF, 10, 34-39, 1999.

COTA, I.E., TRONCOSO-ROJAS, R., SOTELO-MUNDO, R., SÁNCHEZ-ESTRADA, A. TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. **Scientia Horticulturae**, 112(1), 42-50, 2007.

CRISÓSTOMO, J.R., CAVALCANTI, J.J.V., BARROS, L.M., ALVES, R.E., FREITAS, J.G., OLIVEIRA, J.N. Melhoramento do cajueiro-anão-precoce: avaliação da qualidade do pedúnculo e a heterose dos seus híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24, 2, 477-480, 2002.

CRISOSTOMO, J.R. BARROS, L.M. PAIVA, J.R., CAVALCANTI, J.J.V. MELHORAMENTO GENÉTICO DO CAJUEIRO. IN: QUEIROZ, M.A., GOEDERT, C.O., RAMOS, S.R.R. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro. Embrapa Semi-Árido, 1999. Disponível em: <http://www.cpatssa.embrapa.br/catalogo/livrorg/cajumelhoramento.pdf> Acesso em: 10out2010.

CUNHA, R.B., CASTRO, M.S., FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano IX, 36, 2006.

CYSNE, A.Q. **Métodos de seleção de plantas de cajueiro resistentes a resinose (*Lasiodiplodia theobromae*)**. 2006. Monografia, Curso de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

DANA, M.M. PINTOR-TORO, J.A. CUBERO, B. Transgenic Tobacco Plants Overexpressing Chitinases of Fungal Origin Show Enhanced Resistance to Biotic and Abiotic Stress Agents. **Plant Physiology**, 142(2), 722-730, 2006.

DAMERVAL, C., ZIVY, M., GRANIER, F., DE VIENNE, D. In: Chrambach, A., Dunn, M. J., Radola, B.J. (Eds.) **Advances in Electrophoresis**, VCH, Weinheim, Germany, pp. 265-280, 1988.



DASS, C. (Ed) Introduction to mass spectrometry. In: **Principles and practice of biological mass spectrometry**, Amsterdam: Wiley, 2001.

DATTA, S.K., MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**. Florida: Ed. CRC Press, 1999. 291p.

DATTA, K., TU, J., OLIVA, N., ONA, I., VELAZHAHAN, R., TWNG WAH, MEW, T.W., MUTHUKRISHNAN, S., DATTA, S.K. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. **Plant Science**, 160(3), 405-414, 2001.

EMBRAPA. **Clones de cajueiro-anão precoce**. Embrapa Agroindústria Tropical. 2005. 2p.

EL-SHORA, H.M. Properties of phenylalanine ammonia-lyase from Marrow cotyledons. **Plant Science**, 162, 1-7, 2002.

ELVIRA, M.I., GALDEANO, M.M., GILARDI, P., GARCIA-LUQUE, I., SERRA, M.T. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interaction of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L plants. **Journal of Experimental Botany**, 59, 1253-1265, 2008.

FERNANDES, C. F. **Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum***. 2004. 162f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

FERREIRA, R.B., MONTEIRO, S., FREITAS, R., SANTOS, C.N., CHEN, Z., BATISTA, L.M., DUARTE, J., BORGES, A., TEIXEIRA, A.R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, 8, 677-700, 2007.

FIELDS, S. Proteomics in genomics. **Science**, 291(5507), 1221-1224, 2001.

FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust: its genetic and other implications. **Phytopathology**, 45, 680-685, 1955.

FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, 92, 696-717, 1994.

FREIRE, F.C.O. **A resinose do cajueiro**. Caju Informativo, Fortaleza: 4(1-2), 1991.

FREIRE, F.C.O.; BARGUIL, B.M. **Fungos que deterioram amêndoas de cajueiro no Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Comunicado Técnico, 64), 2001.

FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E. Doenças das Spondias—cajarana (*S. cytherera* Sonn.), cajazeira (*S. mombin* L.), ciriguela (*S. purpurea* L.), umbu (*S. tuberosa* A. Camp.) e umbuguela (*Spondia* sp.) no Brasil. **Agrotrópica**, 9, 75–82, 1997.

FREIRE, F.C.O., CARDOSO, J.E., SANTOS, A.A., VIANA, F.M.P. Diseases of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, 21, 489–94, 2002.

FREIRE, F.C.O., VIANA, F.M.P., CARDOSO, J.E., SANTOS, A.A. **Novos hospedeiros do fungo *Botryodiplodia theobromae* no estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Comunicado Técnico, 91), 2004.

FRITIG, B., HEITZ, T., LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. **Current Opinion in Immunology**, 10, 16-22, 1998.

FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL. **Os frutos sociais do caju**. N T Mendes Editora. 203p., 2010.

GAY, C., COLLINS, J., GEBICKI, J.M. Hidroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. **Analytical Biochemistry**, 273, 149-155, 1999.

GÓMEZ-VIDAL, S., TENA, M., LOPEZ-LLORCA, L.V., SALINAS, J. Protein extraction from *Phoenix dactylifera* L. leaves, a recalcitrant material, for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, 29, 448–456, 2008.

GONDIM, D.M.F., TERA, D., MARTINS-MIRANDA, A.S., VASCONCELOS, I.M., OLIVEIRA, J.T.A. Benzo-thiadiazole-7-carbothioic acid *S*-methyl ester does not protect melon fruits against *Fusarium pallidorozeum* infection but induces defence responses in melon seedlings. **Journal of Phytopathology**, 156, 607-614, 2008.

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

GRAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 43, 205-227, 2005.

HAGERMAN, A.E. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. **Journal of Chemical Ecology**, 13, 437–449, 1987.

HAHLBROCK, K., SCHEEL, D., LOGEMANN, E., NURNBERGER, T., PARNISKE, M., REINOLD, S. Oligopeptide elicitor-mediated defence gene activation in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, 92, 4150–4157, 1995.



HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55(2), 77-84, 1999.

HAMMERSCHMIDT, R. Antioxidants and regulation of defense. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 66, 211-212, 2005.

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 48, 575-607, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D. G. (2000) **Responses to Plant Pathogens In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. BB Buchanan, W Gruissem and RL Jones (eds.), 1102- 1156, American Society of Plant Physiology, Rockville, Maryland, USA.

HAVIR, E. A., MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 84, 450-455, 1987.

HEIL, M., BOSTOCK, R. M. Induced Systemic Resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, 89, 503-512, 2002.

HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Cambridge. Cambridge University Press, 1980.

HONG, J.K., HWANG, B.K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CAC<sub>hi</sub>2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CAC<sub>hi</sub>2-overexpressing Arabidopsis. **Planta**, 223(3), 433-448, 2006.

HUANG, X., LIU, L., CHEN, J., ZHAI, Y. Comparative proteomic analysis of the response in resistant and susceptible maize inbred lines to infection by *Curvularia lunata*. **Progress in Natural Science**, 19, 353-358, 2009.

HURKMAN, W.J., TANAKA, C.K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, 81, 802-806, 1986.

INZÉ, D., MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, 104, 153-158, 1995.

IRITI, M., FAORO, F. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. **Journal of Phytopathology**, 15, 171-180, 2003.

JORRÍN-NOVO, J.V., MALDONADO, A.M., ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S., VALLEDOR, L., CASTILLEJO, M.A., CURTO, M., VALERO, J., SGHAIER, B., DONOSO, G., REDONDO, I. Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental

design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, 72(3), 285-314, 2009.

JUCÁ, T.L. **Estudo proteômico de sementes em desenvolvimento e maduras de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010

KEEN N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, 24, 447-463, 1990.

KEEN, N. **Mechanisms of Pest Resistance in Plants**. Bethesda, MD: Workshop on Ecological Effects of Pest Resistance Genes in Managed Ecosystems. 1999

KERN, M. F.; MARASCHIN, S. D.; ENDT D. D.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; PASQUALI, G. Expression of a chitinase gene from *Metarhizium anisopliae* in tobacco plants confers resistance against *Rhizoctonia solani*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 160(7), 1933-1946, 2010.

KISHIMOTO, K., NISHIZAWA, Y., TABELI, Y., HIBI, T., NAKAJIMA, M., AKUTSU, K. Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). **Plant Science**, 162(5), 655-662, 2002.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, 34, 713-721, 1993.

LANDRY, S.J., GIERASCH, L.M. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to in vivo protein folding. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, 23, 645-669, 1995.

LIANG, X.Q., HOLBROOK, C.C., LYNCH, R.E., GUO, B.Z. beta-1,3-Glucanase Activity in Peanut Seed (*Arachis hypogaea*) is Induced by Inoculation with *Aspergillus flavus* and Copurifies with a Conglutin-Like Protein, **Phytopathology**, 95(5), 506-511, 2005.

LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 301-319, 1988.

LIN, Y-Z., CHEN, H-Y., KAO, R., CHANG, S-P., CHANG, S-J., LAI, E-M. Proteomic analysis of rice defense response induced by probenazole. **Phytochemistry**, 69, 715-728, 2008.

LIU H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v. 35, p. 263-269, 2005.



MALECK, K., DIETRICH, R. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? **Trends in Plant Science**, 4(6), 215-219, 1999.

MAKKAR, H.P.S., BLUEMMEL, M., BOROWY, N.K., BECKER, K., Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 61, 161–165, 1993.

MARGIS-PINHEIRO, M., SANDRONI, M., LUMMERZEIM, M., OLIVEIRA, D.A. Defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, 25, 24-31, 1999.

MARTINS-MIRANDA, A. S. **Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântula de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] exposta à salinidade e deficiência hídrica**. 2002. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2002.

MATAMOROS, M.A., DALTON, D.A., RAMOS, J., CLEMENTE, M.R, RUBIO, M.C, BECANA, M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. **Plant Physiology**, 133, 499-509, 2003.

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

MEHTA, A., BRASILEIRO, A.C.M., SOUZA, D.S.L., ROMANO, E., CAMPOS, M.A., GROSSI-DE-SÁ, M.F., SILVA, M.S., FRANCO, O.L., FRAGOSO, R.R., BEVITORI, R., ROCHA, T. L. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? **FEBS Journal**, 275, 3731-3746, 2008.

MEIRELES, K.G.X **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massas**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia), Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, 2006.

MELO, Q.M.S. (Ed.) **Caju: Fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 62p. (Frutas do Brasil, 26), 2002.

MOHALI, S., BURGESS, T.I., WINGFIELD, M.J. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. **Forest Pathology**, 35, 385–396, 2005.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SASUTA, M. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and Ds-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, 160, 355-360, 2001.

MUKHERJEE, A.K., CARP, M.J., ZUCHMAN, R., ZIV, T., HORWITZ, B.A., GEPSTEIN, S. Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. **Journal of Proteomics**, 73, 709-720, 2010.

NIMCHUK, Z., ROHMER, L., CHANG, J.H., DANGL, J.L. Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. **Current Opinion in Plant Biology**, 4, 288-294, 2001.

OELJEKLAUS, S., MEYER, H.E., WARSCHEID, B. Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. **Proteomics**, 72, 545-554, 2009.

OLIVEIRA, V.H. (Ed.) **Cultivo do cajueiro anão precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical (Sistemas de Produção, 1), 2002.

OLIVEIRA, V.H. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30(1), 1-3, 2008.

OLIVEIRA, V.H. **Cajucultura: primeiro site brasileiro sobre a cultura do cajueiro**. Disponível em: <<http://www.cajucultura.cjb.net>>. Acesso em: 10 mar. 2010.

PAIVA, J.R., BARROS, L.M. **Clones de Cajueiro: Obtenção, Características e Perspectivas**. Embrapa Agroindústria Tropical, Documentos, 82. 2004

PAIVA, J.R., CARDOSO, J.E., BARROS, L.M., CAVALCANTI, J.J.V., ALENCAR, E.S. **Comportamento de clones de cajueiro anão precoce no semi-árido do estado do Piauí**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 4p. (Comunicado Técnico, 63), 2001.

PAIVA, J.R., CARDOSO, J.E., BARROS, L.M., CRISÓSTOMO, J.R., CAVALCANTI, J.J.V., ALENCAR, E.S. **Clone de cajueiro-anão-precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na região semi-árida do nordeste**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 4p. (Comunicado Técnico, 78), 2002.

PAIVA, J.R., CRISÓSTOMO, J.R., BARROS, L.M. **Recursos genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 43p. (Documentos, 65), 2003.

PAIVA, J.R., CARDOSO, J.E., MESQUITA, A.L.M., CAVALCANTI, J.J.V., SANTOS, A.A. Desempenho de clones de cajueiro-anão precoce no semi-árido do Estado do Piauí. **Revista Ciência Agronômica**, 39(2), 295-300, 2008.

PANINA, Y.S., VASYUKOVA, N.I., OZERETSKOVSKAYA, O.L. Inhibition of Activity of Catalase from Potato Tubers by Salicylic and Succinic Acids. **Doklady Biological Sciences**, 397, 131-133, 2004.



- PASCHOLATI, S.F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Ed.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 417-454.
- PATTERSON, B.D., PAYNE, L.A., CHEN, Y-Z, GRAHAM, D. An Inhibitor of Catalase Induced by Cold in Chilling-Sensitive Plants. **Plant Physiology**, 76(4), 1014-1018.
- PEIXOTO, P.H. P., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MOSQUIM, P.R., MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11(3), 137-143, 1999.
- PENG, M., KUÉ, J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. **Phytopathology**, 82, 696-699, 1992.
- PEREIRA, A.L., SILVA, G.S., RIBEIRO, V.Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, 31(6), 572-578, 2006.
- PRASHANTH, S.R., SADHASIVAM, V., PARIDA, A. Overexpression of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase from a mangrove plant *Avicennia marina* in indica Rice var Pusa Basmati-1 confers abiotic stress tolerance. **Transgenic Research**, 17, 281-291, 2008.
- PROFOTOVÁ, B., BURKETOVÁ, L., VALENTOVÁ, O. Chitinase isozymes induced by TYMV and *Leptosphaeria maculans* during compatible and incompatible interaction with *Brassica napus*. **Biologia Plantarum**, 51(3), 507-513, 2007.
- ' , B.F., CANDIDO, E.S., CAMPOS, P.F., FRANCO, O.L., KRÜGER, R.H. Proteomic approaches to study plant pathogen interactions. **Phytochemistry**, 71, 351-362, 2010.
- QURESHI, M.I., QADIR, S., ZOLLAA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, 164, 1239-1260, 2007.
- PUNITHALIGAM. E. *Botryodiplodia theobromae* CMI **Descriptions of pathogenic fungi and bacteria**, 159, 1-3, 1976.
- REISSIG, J. L., SROMENGER, J. L., LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biological Chemistry**, 217, 959-966, 1955.
- RESENDE, M.L.V., COSTA, J.C.B., CAVALCANTI, F.R., RIBEIRO JÚNIOR, P.M., CAMILO, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacaueteiro contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, 32(3), 2007.
- RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M. L., CHAVES, Z.M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, 28, 123-130, 2003

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. da; QUEIROZ, M. E. L. R A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal** (Brazil), 21(3), 133-149, 2005.

ROCHA, T.L., COSTA, P.H.A., MAGALHÃES, J.C.C., EVARISTO, R.G.S., VASCONCELOS, E.A.R., COUTINHO, M.V., PAES, N.S., SILVA, M.C.M., GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 12p. (Comunicado Técnico, 136), 2005.

ROSSETTI, A.G., AQUINO, A.R.L. Influência do tipo de ramo sobre o crescimento e produção do cajueiro anão precoce de copa substituída. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24(3), 2002.

SALEKDEH, G.H., KOMATSU, S. Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, 7(16), 2976-2996, 2007.

SARMA, A.D., OEHRLE, N.W., EMERICH, D.W., Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, 379, 192–195, 2008.

SASABE, M., TAKEUCHI, T., KAMOEN, S., ICHINOSE, Y., GOVERS, F., TOYODA, K., SHIRAIISHI, T., YAMADA, T. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. **European Journal of Biochemistry**, 267, 5005–5013, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38, 995-1014, 2005.

SHAH, J.M., RAGHUPATHY, V., VELUTHAMBI, K. Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. **Biotechnology Letters**, 31(2), 239-244, 2009.

SHAW, M.M., RIEDERER, B.M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, 3, 1408–1417, 2003.

SHEORAN, I.S., ROSS, A.R.S., OLSON, D.J.H., SAWHNEY, V.K. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. **Plant Science**, 176, 99-104, 2009.

SHETTY, N.P., JENSEN, J.D., KNUDSEN, A., FINNIE, C., GESHI, N., BLENNOW, A., COLLINGE, D.B., JORGENSEN, H.J. Effects of beta-1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. **Journal of Experimental Botany**, 60(15), 4287-4300, 2009.



SHIM, I-S., MOMOSE, Y., YAMAMOTO, A., KIM, D-W., USUI, K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, 39(3), 285-292, 2003.

SILVA, E.N., FERREIRA-SILVA, S.L., FONTENELE, A.V., RIBEIRO, R.V., VIÉGAS, R.A., SILVEIRA, J.A.G. Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. **Journal of Plant Physiology**, 167, 1157-1164, 2010.

SILVAR, C., MERINO, F., DÍAZ, J. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. **Journal of Plant Physiology**, 165, 1120-1124, 2008.

SOUSA, L.B., FEITOZA, L.L., GOMES, R.L.F., LOPES, A.C.A., SOARES, E.B., SILVA, E.M.P. Aspectos de biologia floral de cajueiros anão precoce e comum. **Ciencia Rural**, 37(3), 882-885, 2007.

SRIDEVI, G., PARAMESWARI, C., SABAPATHI, N., RAGHUPATHY, V., VELUTHAMBI, K. Combined expression of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. **Plant Science**, 175(3), 283-290, 2008.

STEEN, H., MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, 5, 699-711, 2004.

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 35, 235-270, 1997.

STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, 75, 687-706, 1993.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p

TAVARES, S.C.C.H. Perigo ronda as Frutas. **Cultivar Hortaliças e Frutas**. Junho/Julho, 6p. 2003.

TIMPERIO, A.M., EGIDI, M.G., ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, 71(4), 391-411, 2008.

URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, 13, 43-50, 1991.

VANACKER, H., CARVER, T.L.W., FOYER, C.H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley-powdery mildew interaction. **Plant Physiology**, 123, 1289-1300, 2000.

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

VAN LOON LC. In: Datta SK, Muthukrishnan S, (Eds). **Pathogenesis-related proteins in plants**. Boca Raton, FL; 1999, p. 1-19.

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

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

VAN ROSSUM, M.W.P.C., ALBERDA, M., VAN DER PLAS, L.H.W. Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. **Plant Science**, 130, 207-216, 1997.

VASCONCELOS, E.A.R., NOGUEIRA, F.C.S., ABREU, E.F.M., GONÇALVES, E.F., SOUZA, P.A.S., CAMPOS, F.A.P. Protein extraction from cowpea tissues for 2D electrophoresis and MS analysis. **Chromatographia**, 62, 447-450, 2005.

VENTELON-DEBOUT, M., DELALANDE, F., BRIZARD, J.P., DIEMER, H., DORSSELAER, A.V., BRUGIDOU, C. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing Rice yellow mottle virus infection. **Proteomics**, 4, 216-25, 2004.

VOGELI-LANGE, R., HANSEN-GEHRI, A., BOLLER, T., MEINS, F.JR. Induction of the defense-related glucanohydrolases,  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves. **Plant Science**, 54(3), 171-176, 1988.

WALZ, C., GIAVALISCO, P., SCHAD, M., JUENGER, M., KLOSE, J., KEHR, J., Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, 65, 1795-1804, 2004.

WANG, W., SCALI, M., VIGNANI, R., SPADAFORA, A., *et al.* Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, 24, 2369-2375, 2003.

WANG, W., VIGNANI, R., SCALI, M., CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, 27, 2782-2786, 2006.



WEN P-F., CHEN, J-Y., KONG, W. F., PAN, Q-H., WAN, S-B., HUANG, W-D. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. **Plant Science**, 169, 928-934, 2005.

WENDEHENNE, D., DURNER, J., CHEN, Z., KLESSIG, D. F. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry**, 47, 651-657, 1998.

YAO, H., TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, 35, 253-262, 2005.

YAO, Y., YANG, Y-W., LIU, J-Y. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE. **Electrophoresis**, 27, 4559-4569, 2006.

ZHAO, H., WANG, B-C., ZHAO, H-C., WANG, J.B. Stress stimulus induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber seeding. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 44, 36-40, 2005.