Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Identificação de proteínas diferencialmente expressas e avaliação da
composição química da parede celular de folha de clones de
Eucalyptus grandis em resposta à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter)**

Luis Felipe Boaretto

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2008**

Luis Felipe Boaretto
Engenheiro Agrônomo

Identificação de proteínas diferencialmente expressas e avaliação da composição química da parede celular de folha de clones de *Eucalyptus grandis* em resposta à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter)

Orientador:

Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Boaretto, Luis Felipe

Identificação de proteínas diferencialmente expressas e avaliação da composição química da parede celular de folha de clones de *Eucalyptus grandis* em respostas à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter) / Luis Felipe Boaretto. - - Piracicaba, 2008.
85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Açúcares 2. Eucalipto 3. Ferrugem (doença de planta) 4. Fungo fitopatogênicos 5. Parede celular vegetal 6. Proteínas de plantas I. Título

CDD 634.9734

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Naquela fria manhã do dia 30 de maio do ano de 2007 nasce uma luz, desde então é essa luz que me faz lutar e sempre querer vencer. É nela que encontro forças para continuar qualquer jornada. Malu, filha, todo meu esforço é dedicado a você.

Luisa

***Por ela é que eu faço bonito
Por ela é que eu faço o palhaço
Por ela é que eu saio do tom
E me esqueço no tempo e no espaço
Quase levito
Faço sonhos de crepom***

***E quando ela está nos meus braços
As tristezas parecem banais
O meu coração aos pedaços
Se remenda prum número a mais***

***Por ela é que o show continua
Eu faço careta e trapaça
E pra ela que eu faço cartaz
É por ela que espanto de casa
As sombras da rua
Faço a lua
Faço a brisa
Pra Luisa dormir em paz***

(Francis Hime – Chico Buarque /1979)

DEDICO

A minha Família, base do meu caráter

*Darci, Eliete, Karol e Flávio,
exemplos de força, otimismo e perseverança.
Tudo que sou e um dia o que chegarei a ser
é fruto do que vocês plantaram em mim...
Amor, Respeito, Seriedade e muita fé em Deus !*

*A minha companheira Simone
e toda sua família pela força,
paciência e credibilidade
em mim depositada, no momento
mais importante de nossas vidas.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à santíssima trindade, Deus Pai, Deus Filho e Deus Espírito Santo e pela sempre intercessão de Nossa Senhora Auxiliadora nos momentos felizes e mais difíceis ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate pelos ensinamentos valiosos, pela oportunidade, pela confiança, pela amizade, pela orientação e por abrir as portas do seu laboratório.

A Dra. Mônica T. V. Labate pela sua amizade e pelos seus valiosos conselhos na confecção deste trabalho.

Ao Shinitiro Oda e Esteban Gonzáles representantes da SUZANO PAPEL E CELULOSE pelos conselhos e por cederem gentilmente o material vegetal utilizados neste trabalho.

A equipe do proteoma, Alexander, Matheus, Thiago Falda, Eduardo e Fernanda pelo apoio, ajuda no trabalho e ajuda psicológica nos momentos críticos.

Ao Dr. David Moon pelos conselhos e ajuda na finalização do trabalho.

Ao Doutorando Juliano Bragatto pela análises dos carboidratos realizadas e em particular sua amizade e conselhos nos momentos de dificuldade.

Aos amigos do Laboratório Max Feffer, Livia, Ed, Gabriela, Simone, Danielle, Raphael, Mayra, Daniela, Gunta, Juliana, Lilia, Gisele, Felipe, Ivan

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Beatriz Appezzato-da-Glória, Murilo Melo, Ricardo Ferraz de Oliveira e Ricardo Kluge.

A secretária do Programa Maria Solizete pela sua disponibilidade, competência e amizade durante esta jornada.

Aos Professores Márcio Rodrigues Lambais e Ricardo Antunes de Azevedo pela disponibilidade e por permitirem a utilização dos equipamentos que contribuíram no trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, meu muito Obrigado a todos que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Histórico da doença	20
2.2 <i>Puccinia psidii</i> Winter	20
2.2.1 Taxonomia	20
2.2.2 Ciclo de vida	21
2.2.3 Locais de ocorrência	22
2.2.4 Hospedeiros	23
2.3 O gênero <i>Eucalyptus</i>	23
2.4 A ferrugem do <i>Eucalyptus</i> spp	25
2.4.1 A doença	25
2.4.2 Processo de infecção	26
2.4.3 Escala de notas	27
2.4.4 A disseminação da doença	28
2.5 Fisiologia da interação planta-patógeno	29
2.5.1 Mecanismos de defesa vegetal	29
2.5.2 Patossistema planta - patógeno.....	31
2.6 O proteoma aplicado no estudo da interação planta-patógeno	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Multiplicação dos uredósporos de <i>Puccinia psidii</i> Winter	39
3.2 Coleta dos uredósporos de <i>P. psidii</i> e Inoculação do material vegetal	39
3.3 Coleta do material vegetal	41
3.4 Extração das proteínas das folhas de eucalipto	41
3.4.1 Pré-lavagem do material vegetal	41
3.4.2 Extração fenólica das proteínas das folhas de eucalipto	42

3.5 Solubilização das proteínas extraídas	43
3.6 Quantificação das proteínas	43
3.7 Focalização isoeletrica (IEF)	43
3.8 Eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE)	43
3.9 Obtenção e análise das imagens dos 2D-PAGE	44
3.10 Determinação dos carboidratos da parede celular em tecido foliar de plantas de eucalipto via HPAE-PAD.....	44
3.10.1 Quantificação das hemiceluloses	44
3.10.2 Quantificação de celulose	45
3.11 Parâmetros do HPAE-PAD para análise dos carboidratos	46
3.11.1 Parâmetros utilizados para a quantificação dos carboidratos hemicelulósicos e celulósicos	46
3.11.2 Parâmetros utilizados para a quantificação dos ácidos urônicos	47
3.12 Análise estatística	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Instalação do experimento	48
4.2 Coletas do material vegetal	49
4.3 Extração das proteínas	51
4.4 Focalização isoeletrica das tiras IPG	53
4.5 Eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE)	54
4.6 Análise das imagens dos 2D-PAGE	56
4.7 Carboidrato vs. Patossistema <i>E. garndis</i> – <i>P. psidii</i>.....	63
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	72
REFERÊNCIAS	74

RESUMO

Identificação de proteínas diferencialmente expressas e avaliação da composição química da parede celular da folha de clones de *Eucalyptus grandis* em resposta à ferrugem (*Puccinia psidii* Winter)

O *Eucalyptus* é o gênero mais importante para a indústria brasileira de papel e celulose. *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden e seus híbridos são preferencialmente usados pela indústria devido ao rápido crescimento e alta produtividade volumétrica. Embora possua características adequadas à utilização comercial, vários estresses abióticos e bióticos influenciam sua produção. O IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*) destaca a *Puccinia psidii* como sendo a maior ameaça para a cultura nos tempos atuais. A doença não co-evoluiu com o hospedeiro e por essa razão, torna o patógeno um elemento potencial a vencer as barreiras impostas pelo hospedeiro. O fungo ataca plantas jovens, incluindo mudas em viveiros, plantas em jardins clonais e plantações comerciais com até 2 anos de idade. Com o objetivo de identificar proteínas diferencialmente expressas e avaliar as mudanças ocorridas na composição química da parede celular das folhas, o presente trabalho analisou o impacto da presença do fungo sobre os clones comerciais, resistentes (7) e suscetíveis (24), de eucalipto. Os clones de *E. grandis*, 7 e 24, previamente inoculados com uredósporos de *P. psidii*, foram utilizados para extração de proteínas após 24 horas de interação com o fungo. As análises foram realizadas com auxílio de SDS-PAGE de primeira e segunda dimensão, em gradiente de pH na faixa de 4-7, utilizando-se 750 µg de proteínas. As imagens dos géis, em triplicata, analisadas pelo programa (*Image Master Elite* v. 3.01), possibilitaram a identificação de 466 *spots*. A comparação entre os perfis eletroforéticos dos clones que foram analisados e os controles não inoculados, mostrou que o processo de infecção do fungo nas plantas induziu o aparecimento de 72 *spots* exclusivos para o clone 7 além de alterações do volume de outros 115 *spots*. Já para o clone 24, a exposição ao fungo promoveu o aparecimento de 22 *spots* exclusivos e alterações de outros 98. Os perfis eletroforéticos dos clones controle, que não foram expostos ao fungo, mostraram diferenças genéticas entre os clones 7 e 24. O clone resistente, apresentou grande concentração de *spots* na região entre 14 a 45 kDa. Já para o clone suscetível, os *spots* se concentraram na região entre 25 a 97 kDa. A avaliação do conteúdo de carboidratos e ácidos urônicos da parede celular mostrou alterações no conteúdo dos açúcares no material inoculado com *P. psidii*, após 24 horas, 6 e 12 dias de inoculação. Os teores de glicose observados para os clones 7 e 24, já após 24 horas da inoculação, mostraram-se bastante alterados, indicando que esse açúcar possui papel chave no processo de formação da parede celular e conseqüentemente no mecanismo de defesa vegetal.

Palavra-chave: *Eucalyptus*; Proteoma; *Puccinia psidii*; Interação planta-patógeno; Açúcares de parede

ABSTRACT

Identification of proteins differentially expressed and evaluation of the chemical composition of the leaf cell wall in *Eucalyptus grandis* clones in response to the rust fungus (*Puccinia psidii* Winter)

Eucalyptus is the most important genus for the Brazilian pulp and paper industry. *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden and hybrids are preferentially used by the industry due to its rapid growth and high volumetric productivity. Although they possess characteristics adequate for commercial use, various biotic and abiotic stresses influence production. IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*) highlight *Puccinia psidii* as the largest current threat to the culture. The disease did not co-evolve with the host and for this reason has become the pathogen with most potential to overcome the barriers imposed by the host. The fungus attacks young plants, including saplings in nursery, clonal gardens and commercial plants up to 2 years-old. With the objectives of identifying the proteins differentially expressed and evaluate the changes occurring in the chemical composition of the cell walls in the leaves, the present work analyzed the impact of the presence of the fungus on the commercial eucalyptus clones, resistant (7) and susceptible (24). The *E. grandis* clones (7 and 24) were inoculated with *P. psidii* urideospores and proteins extracted after 24 hours interaction with the fungus. The analyses were carried out using a pH gradient (4-7) in the first and SDS-PAGE in the second dimension, loading 750 µg onto the gel. The gel images, in triplicate, were analyzed using the software *Image Master Elite* v. 3.01, allowing the identification of 466 spots. The electrophoretic profiles for each clone were analyzed and compared to the uninoculated controls, showing that the fungal infection process induced the appearance of 72 exclusive spots in clone 7 and an alteration in the volume of another 115 spots. In clone 24, exposure to the fungus induced the appearance of 22 exclusive spots and altered another 98. The electrophoretic profiles of the control clone, not exposed to the fungus, demonstrated genetic differences between the 7 and 24. The resistant clone (7) presented a large concentration of spots around 14 to 45 kDa. In contrast, the susceptible clone (24) presented a concentration of spots around 25 to 97 kDa. Evaluation of the carbohydrate and uronic acid content of the cell wall showed an alteration in the sugar content in the material exposed to *P. psidii* after 24 hour, 6 and 12 days after inoculation. The glucose levels observed for clones 7 and 24 were considerable altered 24 hours after inoculation, indicating that this sugar has a key role in cell wall formation and consequently in the plant defense mechanism.

Keywords: *Eucalyptus*; Proteome; *Puccinia psidii*; Interaction plant-pathogen; Cell wall sugars.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do ciclo de vida da <i>Puccinia psidii</i>	22
Figura 2 – Processo de germinação, penetração e formação do haustório de <i>Uromyces</i> (fungo biotrófico, causador da ferrugem do feijoeiro)	26
Figura 3 – Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem <i>Eucalyptus</i> sp, com quatro classes de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade; S1 = pústulas < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas > 1,6 mm de diâmetro	28
Figura 4 – Representação esquemática do desencadeamento da defesa vegetal. Os elicitores, moléculas do patógeno, são responsáveis por iniciarem o mecanismo de defesa vegetal, estas interagem com os receptores de membrana, então o processo desencadeia uma cascata de sinalização	33
Figura 5 – Multiplicação dos uredósporos de <i>P. psidii</i> em material suscetível (M09D1). A) Folhas de <i>Eucalyptus grandis</i> infectadas naturalmente, proveniente do campo. B) Raspagem dos sítios dos soros e coleta em placa de Petri. C) Aspersão da solução de uredósporos sobre as folhas do material M09D1	40
Figura 6 – Esquema de coleta dos uredósporos do material M09D1 e inoculação nos clones 07 e 24. A) Material suscetível M09D1. B) Pústulas de uredósporos de <i>P. psidii</i>. C) Coleta dos uredósporos no sítio de infecção. D) Aspersão da solução de uredósporos sob os clones resistente (07) e suscetível (24)	41
Figura 7 – A) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) 24 horas após inoculação dos uredósporos. B) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e	

suscetível (inferior) 6 dias após inoculação dos uredósporos. C) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) 9 dias após a inoculação dos uredósporos. D) Aspecto geral do clone suscetível 12 dias após inoculação dos uredósporos. E) Folha do clone suscetível após 12 dias de inoculação dos uredósporos. F) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) que não foram expostas aos uredósporos, 12 dias após a aspersão da solução de água com Tween 20 49

Figura 8 – Da esquerda para direita. Gel desnaturante comparando os métodos de extração: M) marcador (kDa); T+F) TCA seguido de extração fenólica; F) extração fenólica e T) extração somente com TCA. Gel desnaturante de uma dimensão, comparando o perfil protéico dos tempos pré-estabelecidos de coleta dos clones resistentes e suscetíveis, M) marcador (kDa) 52

Figura 9 – A) Focalização isoeletrica das proteínas de folhas de eucalipto submetidas a uma voltagem acumulada abaixo de 70.000 V.h, em faixa de pI 3-10. B) Focalização isoeletrica das proteínas de folhas de eucalipto submetidas a uma voltagem acumulada igual a 75.000 V.h, em faixa de pI 3-10. Na mesma figura observa-se um predomínio das proteínas correspondentes ao pI 4-7 53

Figura 10 - Géis bi-dimensionais com pI 4-7 dos clones resistentes (R) e suscetíveis (S) controle (C) e inoculado (I) corados com G 250 55

Figura 11 - Comparação do clone resistente com exposição ao fungo e sem a exposição ao fungo, 24 horas de interação. (+) *spots* que apresentaram aumento no volume da proteína; (-) *spots* que apresentaram redução no volume da proteína; apenas os números

referem-se a *spots* que apareceram devido a presença do patógeno. As marcas em vermelho referem-se à marcação e detecção automática dos *spots* pelo programa de análise de imagem. Faixa de pI 4-7 57

Figura 12 - Comparação do clone suscetível com exposição ao fungo e sem a exposição ao fungo, 24 horas de interação. (+) *spots* que apresentaram aumento no volume da proteína; (-) *spots* que apresentaram redução no volume da proteína; apenas os números referem-se a *spots* que apareceram devido a presença do patógeno. As marcas em vermelho referem-se à marcação e detecção automática dos *spots* pelo programa de análise de imagem. Faixa de pI 4-7 58

Figura 13 - A) Controle resistente sem a exposição do fungo, os números com as setas indicam proteínas exclusivas desse genótipo. B) Controle suscetível sem a exposição do fungo, os números com as setas indicam proteínas exclusivas desse genótipo. Ambos os géis com pI na faixa de 4-7 59

Figura 14 - *Spots* comuns dos clones resistentes e suscetíveis quando expostos aos uredósporos da ferrugem, pI 4-7 60

Figura 15 - Visão geral das comparações dos géis 2D-PAGE realizadas entre o clone resistente e clone suscetível 62

Figura 16 - Comparação entre níveis de glicose dos clones resistentes e suscetíveis com 24 horas, 6 dias e 12 dias após inoculação com uredósporos em relação ao controle não inoculado 67

Figura 17 - Comparação entre níveis de celulose, galactose, xilose e ácido galacturônico, dos clones resistentes e suscetíveis com 24 horas, 6 dias e 12 dias após inoculação com uredósporos em relação ao controle não inoculado 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abreviatura dos tratamentos estabelecidos dentro dos tempos de coletas determinados para os clones resistente e susceptível	41
Tabela 2 - Composição química da parede celular da folha dos clones resistentes de eucalipto relativo ao controle não inoculado (CR24). Os valores são médias expressas em mg/g de matéria seca	64
Tabela 3 - Composição química da parede celular da folha dos clones suscetíveis de eucalipto relativo ao controle não inoculado (CS24). Os valores são médias expressas em mg/g de matéria seca	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABA/WDS – *absicic acid / water deficit*

ACN – acetonitrila

cm – centímetro

DTT – dithiothreitol

dpi – pontos por polegada (*dots per inch*)

EDTA - Etilenodiaminatetracetato

g - força gravitacional

g – grama

H₂O Milli-Q – água destilada deionizada e filtrada a 0,2 µm

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

HNO₃ – ácido nítrico

HPAE-PAD – *High Performance Anion Exchange- Pulsed Amperometric Detection*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IAA - iodoacetamida

IEF – Isoelectric focalization - focalização isoeletrica

kDa – quilo Dalton

M – molar

m³ – metro cúbico

mA - miliampere

min - minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

mol/L – mol por litro

ms - milisegundo

NaOAc – Acetato de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NRP – *N-rich protein*

°C – grau centígrado

p/v – peso por volume

pH – potencial hidrogeniônico

pI – ponto isoelétrico

PM – peso molecular

pmol – picomol

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

psi – libra por polegada quadrada; unidade de pressão no sistema inglês/americano

PVPP – polivinilpolipirrolidona

SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression* – análise serial da expressão gênica

SDS – dodecil sulfato de sódio

TCA – ácido tricloroacético

TCTP – *translationally-controlled tumour protein*

TFA – ácido trifluoroacético

USP – *universal stress protein*

V – volt

v/v – volume por volume

V.h – volt hora

µg – micrograma

µl – microlitro

1 INTRODUÇÃO

As florestas representam uma importante fonte de recursos renováveis para geração de energia, produção de polpa e papel e também para a construção. Nos últimos anos, o setor florestal brasileiro vem anunciando e realizando investimentos significativos, frente a outros países. Até 2012, o setor florestal-industrial pretende investir cerca de US\$ 20 bilhões, dos quais US\$ 14 bilhões no segmento de papel e celulose e o restante, US\$ 6 bilhões, no segmento de produtos de madeira sólida. Este montante representa cerca de 80% a mais de investimento na área, em relação a outros países da América do Sul, como Chile e Uruguai (ABRAF, 2006).

As florestas plantadas destacam-se por representarem a principal fonte de suprimento de madeira das cadeias produtivas de importantes segmentos industriais, como os de celulose e papel, produtos sólidos de madeira, móveis, siderurgia e carvão vegetal, energia e produtos de madeira sólida (ABRAF, 2006). A madeira é o quinto produto, em ordem de importância, do comércio mundial (PLOMION et al., 2001). Estima-se que todo o setor de base florestal brasileiro emprega direta e indiretamente 6,5 milhões de pessoas, o que corresponde a 7,4% da população economicamente ativa do País (ABIMCI, 2006). A produção total brasileira de madeira em toras, em 2005, oriunda de florestas plantadas, foi cerca de 110,6 milhões de metros cúbicos, 54,4% referentes à fabricação de celulose e papel e 45,6% a outras finalidades, como fabricação de móveis e construção civil. O Estado de São Paulo é o principal produtor de madeira em tora de floresta plantada com 24,06 milhões de metros cúbicos, que representam 23,9% do total nacional. Também no Estado de São Paulo encontra-se o principal produtor de madeira para celulose e papel. De 2004 para 2005 a produção cresceu 5,4%; passou de 14,8 milhões de metros cúbicos para 15,6 milhões de metros cúbicos. Desse total, 30,9% destinou-se à fabricação de celulose e papel. Em segundo lugar está o Estado da Bahia, com 11,9 milhões de metros cúbicos e, na sequência, o Estado do Paraná, com 7,5 milhões de metros cúbicos e Santa Catarina, com 6,04 milhões de metros cúbicos (SBS, 2006).

O desenvolvimento da tecnologia silvicultural no Brasil nas últimas décadas e as condições naturais favoráveis ao plantio florestal tem proporcionado além dos ganhos de produtividade, a redução na rotação das florestas plantadas e a conseqüente diminuição dos custos de produção florestal. O menor custo da madeira de florestas plantadas no Brasil, em relação aos países do Hemisfério Norte, tem criado importantes vantagens comparativas e competitivas na cadeia de produtos de origem florestal (ABRAF, 2006). As empresas, detentoras

de florestas plantadas no Brasil, adotam avançados padrões de manejo e atingem reconhecimento mundial com os resultados de melhoramento genético. Atualmente, grande parcela das florestas plantadas de eucalipto é originária de plantios clonais de alta produtividade com adaptação e tolerância a fatores bióticos e abióticos. Ao longo dos últimos 30 anos os ganhos em produtividade volumétrica, resultantes dos trabalhos de pesquisa e melhoramento genético nas florestas de eucalipto, quase triplicaram. A produtividade média dos plantios de eucalipto na década de 90 era de aproximadamente 26 m³/ha.ano, passando para 38 m³/ha.ano em 2005. (ABRAF, 2006).

A madeira por ser uma formidável fonte de energia renovável e de fibras (papel e celulose), permite ao setor florestal brasileiro um grande potencial para os serviços ambientais, tais como fixação de carbono, proteção de mananciais, conservação das margens das hidrovias, preservação da biodiversidade e o equilíbrio climático (SBS, 2006). Durante a formação das plantações florestais, ocorre uma grande incorporação de CO₂, que contribui para uma redução potencial do aquecimento global (PLOMION et al., 2001). As plantações de eucalipto armazenam 9,2 toneladas de carbono por ano e ainda podem substituir ou reduzir o consumo de combustíveis fósseis (SBS, 2006). Alguns mercados mundiais importantes como a Comunidade Européia e os Estados Unidos estão destinando fundos governamentais e privados com objetivo de obterem retorno financeiro e ambiental. No ano de 2004 o mercado de carbono negociou cerca de US\$ 670 milhões, ou seja, o dobro do que foi negociado em 2003. Já para o ano de 2007, estima-se que este valor atinja US\$ 13 bilhões. Isso coloca o Brasil numa posição crucial para esse mercado, além da projeção para o mercado internacional. Pesquisas apontam que o Brasil representa cerca de 10 % da fatia desse grande empreendimento, tendo como principais concorrentes a China, Índia e países da Europa Ocidental (SBS, 2006).

Dessa forma, relacionado o rendimento da produção à questão econômica, plantas que sofrem ataques de patógenos ou são submetidas a condições ambientais inadequadas, interferem nas suas funções fisiológicas normais. Nessas plantas, há um desbalanço entre o que é produzido e o que é consumido, o que pode gerar um prejuízo no desenvolvimento do vegetal caracterizando assim o que chamamos de doença (AGRIOS, 1997). Fungos e bactérias são os principais agentes patogênicos que interferem em funções básicas (ALFENAS et al., 2004). A ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii* Winter é, atualmente, uma doença muito comum e severa em plantações suscetíveis à doença com menos de dois anos de idade. Em florestas plantadas de

Eucalyptus grandis com 12 meses de idade severamente infestadas com ferrugem, verificou-se uma redução do diâmetro das árvores em 28% e redução na altura em 35% quando comparadas com as árvores não atacadas (SILVEIRA et al., 1998).

Assim, o objetivo desse trabalho foi identificar, através da proteômica, as proteínas envolvidas na resposta de dois clones comerciais de eucalipto (resistente e suscetível) expostos à *Puccinia psidii*. Bem como avaliar alterações na composição química da parede celular da folha dos clones durante o período de infecção. A biotecnologia juntamente com as técnicas de proteômica, apresentam grande potencial no setor florestal, o que vem revolucionando o conhecimento e o desenvolvimento econômico da área. A interação entre as diversas áreas, como por exemplo a genética e fisiologia, permitirá a descoberta de novos genes e proteínas, além de novas perspectivas sobre a estrutura, função e interação em planta quando atacada pelo patógeno. O foco da proteômica é justamente a genética reversa. Através da proteína pode-se percorrer o caminho inverso, e a partir dele, identificar genes potenciais envolvidos no mecanismo de resistência. Na indústria florestal, a seleção de clones resistentes à ferrugem e altamente produtivos é muito desejável. A identificação de proteínas que funcionem como marcas de resistência, permitiria a seleção de clones com maior rapidez e eficiência em um menor tempo e, com baixo custo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da doença

Embora existam vagas menções de ferrugens que atacam plantas de eucalipto no Brasil relatadas em 1912 (JOFFILY, 1944) e 1929 (GONÇALVES, 1929), em termos científicos, a primeira descrição da ferrugem do eucalipto causada por *Puccinia psidii*, foi feita em 1944 por Joffily, no Estado do Rio de Janeiro em mudas de *Eucalyptus citriodora*. Entretanto, a primeira constatação que se tem notícia sobre o estabelecimento da ferrugem, causando danos econômicos significativos foi em 1973, num viveiro e em plantações de *Eucalyptus grandis* com idade aproximada de 18 meses na costa do Espírito Santo (FERREIRA, 1981). De 1974 a 1979, na costa do Espírito Santo, Vale do Rio Doce e na Zona da Mata de Minas Gerais, foram registrados vários casos de ferrugem esporádicos, porém severos, afetando sempre plantações com menos de dois anos de idade (FERREIRA, 1982). De 1979 a 1980, nas regiões do Vale do Rio Doce, Cerrado e Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Nordeste do Espírito Santo e Sudeste da Bahia, ocorreram muitos casos severos de ferrugem. Nesse período, destacaram-se os extensos focos verificados nas regiões de Gunhães e Itapetininga – MG, com perdas de mais de 300 hectares, devastados pela doença. A partir destes relatos, conclui-se que a ferrugem deixou de ser uma doença cujos danos são consideráveis apenas em raras ocasiões (KRUGNER, 1980). Assim a ferrugem deve ser considerada como doença crítica para plantações suscetíveis até a idade correspondente a uma altura máxima de plantas de 4 metros.

2.2 *Puccinia psidii* Winter

2.2.1 Taxonomia

Puccinia psidii Winter foi descrita no Brasil pela primeira vez em goiabeira (*Psidium guajava* L.) por George Winter, em material coletado por Ernest H. G. Ule, no Estado de Santa Catarina. A descrição original foi publicada na Revista Hedwigia n. 24, p. 161 de 1864 (FIGUEIREDO, 2001).

Os fungos do gênero *Puccinia* pertencem à família Pucciniaceae, ordem Uredinales (Ferrugens), classe Basidiomycetes (Urediniomycetes). A ordem das Uredinales que apresenta cerca de 155 gêneros e mais de 3.000 espécies relatadas (GEGURINOVIC, 2005; GEGURINOVIC, 2006). Do total das espécies, cerca de 800 são conhecidas, sendo que muito pouco se sabe sobre sua biologia e ciclo vital. Alguns gêneros merecem destaque pela ocorrência

freqüente como *Hemileia*, *Uromyces*, *Phakopsora*, *Phragmidium*, *Cronartium* e *Melampsora* (KRUGNER, 1995). Em recente revisão de espécies patogênicas da ordem Uredinales, Simpson (2006) descreveu 8 espécies de fungos que causam a ferrugem, que são: *Uredo psidii*, *Uredo rangelii*, *Uredo seclusa* e *Puccinia psidii*. As outras 4 espécies são: *Phakopsora rossmaniae*, *Physopella juei*, *Physopella xanthostemonis* e *Puccinia cygnorum*.

2.2.2 Ciclo de vida

Puccinia psidii Winter é a única espécie causadora da ferrugem confirmada, capaz de infectar o eucalipto (COUTINHO et al., 1998). Estes patógenos são capazes de colonizar intercelularmente os tecidos vegetais e causar uma infecção estável com um dano mínimo ao seu hospedeiro (MENDGEN; HAHN, 2002). Por essa razão são denominados organismos biotróficos, ou seja, precisam dos hospedeiros vivos para completar seu ciclo de vida. O biotrofismo caracteriza-se pela presença de uma estrutura de infecção altamente desenvolvida, atividade secretora limitada, supressão a longo prazo do mecanismo de defesa do hospedeiro e pela presença de estruturas especializadas para a absorção de nutrientes (MENDGEN; HAHN, 2002). Até a década de 80, o ciclo de vida dessa espécie era desconhecido (COUTINHO et al., 1998). O único estudo conduzido que envolve a morfologia das diferentes fases do ciclo de vida da *Puccinia psidii* foi descrito por Ferreira, 1989. O ciclo ocorre em 4 fases: Fase 1 – aécia, Fase 2 – uredinia, Fase 3 – télia e Fase 4 – basídia. (COUTINHO, et al, 1998). A fase que envolve a produção de gametas anterior a Fase 1 – aécia, ainda não foi caracterizada em eucalipto (COUTINHO et al, 1998), Figura 1.

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida da *Puccinia psidii* Winter. Adaptado de Glen et al. (2007)

2.2.3 Locais de ocorrência

Há registros da ocorrência do fungo no Caribe e América Central: Costa Rica (DI STÉFANO et al., 1998), Cuba (SEEVER; CHARDÓN, 1926), República Dominicana (KERN et al., 1933), El Salvador (CMI 1987), Guatemala (SCHIEBER; SÁNCHEZ, 1968), Jamaica (MAC LACHLAN, 1936), Porto Rico (MAC LACHLAN, 1938), Trinidad e Tobago (BAKER; DALE, 1951); na América do Norte: México (LÉON-GALLEGOS; CUMMINS, 1981), Estados Unidos, no sul da Flórida (MARLATT; KIMBROUGH, 1979; RAYCHHETRY et al., 2001); nas Ilhas do Pacífico, Hawaii (KILLGORE; HEU, 2005) e também na América do Sul: Argentina (DI FONZO, 1946; ACUÑA; GARRAN, 2004), Brasil (WINTER, 1884), Colômbia (MAYER, 1913; CHARDÓN; TORO, 1930), Equador (STENVENSON, 1926), Paraguai (SPEGAZZINI, 1884, 1922), Uruguai (SPEGAZZINI, 1889; KOCH DE BROTONS; BOASSO, 1955; TELECHEA et al., 2003) e Venezuela (CHARDÓN; TORO, 1934; MENON, 1950).

2.2.4 Hospedeiros

Sabe-se hoje, que todos os hospedeiros desta ferrugem são da família botânica Myrtaceae, de onde provém o nome popular desse patógeno conhecido como “ferrugem das Mirtáceas” (FIGUEIREDO, 2001). Como hospedeiros, a *Puccinia psidii* Winter coloniza as espécies de *Eucalyptus grandis*, *E. cloeziana*, *E. phaeotricha*, *E. globulus* e *E. nitens* que são os representantes das espécies de eucalipto mais susceptíveis à ferrugem (ALFENAS et al., 2004). Além do eucalipto, a ferrugem incide em outras espécies dessa família, como goiaba (*Psidium guayaba* L.), uvaia (*Eugenia uvalha* L.), pitanga (*Stenocalyis pitanga* Berg.), jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), jambo [*Syzygium jambos* (L) Alst.] e jamelão [*Syzygium cumini* (L.) Skeels].

2.3 O gênero *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae é composto por mais de 700 espécies, 24 sub-espécies, 24 variedades e vários híbridos naturais, podendo ser encontrado na forma arbustiva ou como árvores de grande porte. As espécies de eucalipto são monóicas, protândricas, e preferencialmente alógamas, embora outros padrões de cruzamento podem ser observados, como autofecundação causada por cleistogamia, fecundação cruzada obrigatória devido à autoincompatibilidade (PRYOR, 1957), macho esterilidade (DAVIS, 1969), e esterilidade feminina (CARR et al., 1971). A análise do cariótipo revelou que a maioria das espécies do gênero tem $2n=22$ cromossomos, caracterizados por seu tamanho extremamente pequeno (RUGGERI, 1961). Estimativas do conteúdo de DNA nuclear (2C) para espécies examinadas por Grattapaglia e Bradshaw (1994), mostraram que o genoma do eucalipto possui cerca de 500 a 700 Mpb.

Nativo da Austrália, o eucalipto atualmente é cultivado predominantemente em regiões de clima tropical e subtropical, entre as latitudes de 40° N e 45° S, em altitudes que variam de 30 a 1000 metros. Possui espécies adaptadas às várias condições de clima e solo, inclusive aqueles solos com salinidade de 2 a 3% (CRESSWELL et al., 1985). No Brasil, o eucalipto foi introduzido por Edmundo Navarro de Andrade, junto à Companhia Paulista de Estrada de Ferro do Estado de São Paulo (ABRAF, 2006). O desenvolvimento inicial desta cultura no país realizou-se entre 1904 e 1909, no horto de Jundiaí, onde Navarro de Andrade comparou várias espécies nativas do Brasil como a peroba, a cabreúva, o jequitibá com espécies exóticas e, entre

elas, sementes de *Eucalyptus globulus*, que ele havia trazido do exterior. Nesses ensaios os eucaliptos sobressaíram-se em relação às demais espécies, de forma que em 1909 a Companhia Paulista de Estradas de Ferro adquiriu mais terras na região de Rio Claro, iniciando plantios dessa espécie em escala comercial. (ABRAF, 2006) A partir dessa época, Navarro de Andrade começou a importar sementes de várias espécies de eucalipto, escolhendo-as de acordo com as regiões ecologicamente semelhantes às da Austrália. Os plantios em larga escala no Brasil tiveram impulso a partir da década de 1960, e se intensificaram principalmente na década de 1970, com o advento do programa de incentivo fiscal aos plantios florestais associados aos investimentos por parte das indústrias de celulose e papel e siderurgia, e o desenvolvimento do melhoramento genético e da tecnologia clonal de eucalipto, responsável pela elevada produtividade florestal alcançada pelo gênero. O eucalipto se adaptou muito bem às condições de cultivo no Brasil e hoje, cerca de 70% da área reflorestada no Brasil é ocupada com espécies do gênero (BACHA; BARROS, 2004). As principais espécies cultivadas atualmente no Brasil são o *Eucalyptus grandis*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis*, *E. saligna*, e *E. urophylla*, entre outras. Além disso foram desenvolvidos cruzamentos entre as espécies, derivando-se espécies híbridas como é o caso do *Eucalyptus urograndis* (*E. urophylla* x *E. grandis*) (ABRAF, 2006).

Dos 850 milhões de hectares do território nacional, aproximadamente 478 milhões são cobertos por florestas (FAO, 2005) e aproximadamente 6 milhões são de florestas plantadas. Das florestas plantadas, mais de 3 milhões de hectares pertencem à cultura do eucalipto, quase 2 milhões ao *Pinus*, e o restante, é subdividido entre outras espécies (seringueira, teca, etc) (VALVERDE, 2005). A alta produtividade média do eucalipto no Brasil, cerca de 45 metros cúbicos por hectare por ano em plantios clonais, associado à produção de fibras e polpas de madeira de alta qualidade, baixo custo e curto período (5-7 anos de desenvolvimento), com um regime que permite até 3 rotações sucessivas e econômicas com ciclo de até 21 anos, são as principais razões do extensivo uso dessa cultura em reflorestamentos para fins comerciais no Brasil e no mundo (HO et al., 1998).

O interesse do melhoramento genético dessa espécie aumentou com a importância das plantações comerciais, o que resultou no desenvolvimento de programas próprios de melhoramento genético por parte das empresas do setor, para atender às necessidades edafoclimáticas de cada região. Graças ao intenso trabalho realizado pelos melhoristas, o Brasil possui atualmente um dos mais importantes bancos de germoplasma do gênero *Eucalyptus*

(ANDRADE, 2001). O melhoramento de plantas envolve quatro componentes importantes, a geração de tipos úteis de variação genética e epigenética, a seleção, a manutenção e multiplicação de caracteres desejáveis obtidos atualmente, via métodos de propagação sexuada e assexuada (MANTELL, 1994). As principais limitações da prática do melhoramento genético de espécies florestais são decorrentes do tempo necessário para completar um ciclo de seleção e recombinação de indivíduos para características quantitativas que se expressam somente em plantas com idades mais avançadas (QUOIRIN; VIEIRA, 1995). A ampliação comercial da engenharia genética e o uso mais freqüente de ferramentas moleculares como a genômica, transcritômica e proteômica, tornam os programas de melhoramento convencional de *Eucalyptus* um processo mais eficiente e específico a ser utilizado.

2.4 A ferrugem do *Eucalyptus* spp

2.4.1 A doença

Com relação à disseminação das estruturas infectivas, esta se dá pela ação dos ventos, das chuvas, insetos e pássaros. Porém, para que a infecção ocorra é necessário existir tecidos em desenvolvimento, além de condições ambientais favoráveis, como temperatura e umidade relativa elevada.

Os sintomas da doença ocorrem inicialmente em mudas de viveiro e em plantas no campo. O ataque restringe-se aos órgãos tenros, como primórdios foliares com seus pecíolos e aos terminais de galhos, ramos e haste principal. Começam por minúsculas pontuações levemente salientes, cloróticas que se transformam em pústulas, onde se expõem, com o rompimento da epiderme, massas pulverulentas de uredósporos, de coloração amarelo-ouro. Nos dias seguintes onde surgem as primeiras pústulas, num limbo tenro, inicia-se a infecção secundária dentro da mesma planta, especialmente pela disseminação do inóculo. Árvores altamente sensíveis ao ataque do patógeno podem ter seu crescimento comprometido pela doença, podendo apresentar áreas hipertrofiadas, verrucosas com forte coloração ferrugínea quando severamente atacadas. (KRUGNER; AUER, 1995).

O desenvolvimento da doença causada por este fungo é dependente de temperatura e umidade foliar adequados. De acordo com Ruiz et al. (1989), há uma correlação entre o progresso causado pela ferrugem (*Puccinia psidii*) em *Eucalyptus grandis* em ambientes com alta umidade relativa ($\geq 90\%$) e temperaturas na faixa de 18-25°C. Tessmann e Dianese (2002) investigaram se

compostos provindos da planta podem promover efeito estimulatório na germinação de uredósporos e observaram que a taxa de germinação foi duplicada justamente, devido à presença de compostos produzidos pelas folhas. Um composto estimulador responsável por duplicar a taxa de germinação dos uredósporos foi detectado e denominado hentriacotane, quando presente em concentrações variando de 20 – 200 mg/L.

Depois da germinação dos uredósporos da ferrugem sobre a superfície foliar, a hifa penetra entre as paredes anticlinais da epiderme foliar chegando diretamente no mesofilo, como visto primeiramente em *S. jambos* (HUNT, 1968), Figura 2.

Figura 2 – Processo de germinação, penetração e formação do haustório de *Uromyces* (fungo biotrófico, causador da ferrugem do feijoeiro). Adaptado de Ferreira e Monteiro (2006)

2.4.2 Processo de infecção

Uma vez dentro do tecido, a colonização é feita através do crescimento micelial intercelular e da emissão de haustórios intracelulares (XAVIER et al., 2001).

No primeiro trabalho de investigação histopatológica da interação *Puccinia psidii* e *Eucalyptus grandis* (XAVIER et al., 2001), os autores descrevem o processo de infecção do patógeno nos genótipos resistentes e suscetíveis, não encontraram diferenças na taxa de germinação de uredosporos entre os dois genótipos testados. Ainda de acordo com o trabalho, 90% dos uredosporos germinaram 6 horas após à inoculação em ambos os genótipos. Depois de 18 horas, mais de 90 % dos uredosporos já haviam formado apressórios nos dois genótipos. Os autores ainda detectaram que a penetração através dos estômatos foi muito baixa; apenas 7% e

2% nos resistentes e suscetíveis, respectivamente, mostrando assim, que o mecanismo de penetração é regido unicamente ao acaso para a ferrugem do eucalipto. Curiosamente, os apressórios não se formaram na maioria dos casos onde houve penetração passiva através dos estômatos. Os genótipos suscetíveis mostraram uma colonização ramificada e rápida após o 3º dia de infecção. Já no caso do genótipo resistente, a formação do haustório no mesofilo foi limitada por uma rápida e localizada necrose das células adjacentes. (XAVIER, 2001).

2.4.3 Escala de notas

A avaliação do nível de resistência à ferrugem sob infecções naturais é feita com base no índice de ferrugem, expresso pela porcentagem média de plantas doentes e pelo número médio de pústulas em 100 folhas de cada árvore (DIANESE et al., 1984). As metodologias para avaliação do nível de resistência sob condições naturais, consideram a incidência da doença e não a severidade da mesma, como parâmetros de medida da ferrugem (KRANZ, 1988).

A avaliação do nível de resistência de plantas inoculadas artificialmente tem sido utilizada como parâmetro o número de pústulas totais, incluindo os uredinais, teliais e mistos, presentes em uma área foliar de 2,4 cm² (RUIZ et al., 1989a). A avaliação por contagem do número de pústulas e a análise dos componentes de resistência apresenta a desvantagem de ser inviável quando se avalia uma grande quantidade de amostras. Faz-se necessário, equipamentos específicos de microscopia, porém são lentos e demandam uma avaliação criteriosa e demorada. Não há uma relação direta entre o tamanho da pústula e sua distribuição na folha. A distribuição da pústula na folha relaciona-se com a distribuição do patógeno, enquanto o tamanho da pústula relaciona-se à suscetibilidade do hospedeiro e à agressividade do patógeno.

Diante da dificuldade de se adotar um critério de avaliação do nível de resistência preciso e de forma padronizada, adotou-se nesse trabalho, uma escala de notas simples e precisas para a avaliação do nível de resistência em plantas inoculadas artificialmente, considerando a classe da severidade de acordo com o tamanho da pústula (JUNGHANS, 2003), Figura 3. Nesse caso o diâmetro de cada pústula definido como unidade de medida, foi avaliado com auxílio de uma escala de notas: S0 – imunidade ou reação de hipersensibilidade, S1 – pústulas puntiformes (< 0,8 mm de diâmetro), S2 – pústulas medianas (de 0,8 mm a 1,6 mm de diâmetro), S3 – pústulas grandes (> 1,6 mm de diâmetro), podendo ocorrer em pecíolos e hastes jovens (JUNGHANS, 2003).

Figura 3 - Escala de notas para avaliação da resistência à ferrugem *Eucalyptus* sp, com quatro classes de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade; S1 = pústulas < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas > 1,6 mm de diâmetro (JUNGHANS, 2003)

2.4.4 A disseminação da doença

A ferrugem é um problema sério para as plantações de eucalipto em várias regiões do mundo, em particular na Austrália, onde o eucalipto é nativo. A Austrália possui cerca de metade das mirtáceas do mundo, representadas por cerca de 70 gêneros e 1.646 espécies nativas (Department of Environment and Heritage 2004a). A atenção destinada ao agente causador da ferrugem (*Puccinia psidii*) tem se voltado principalmente à questão da biossegurança na Austrália e Nova Zelândia, onde esse fungo praticamente é inexistente (NAVARATNAM, 1986; RIDLEY et al., 2000; MIREKU; SIMPSON, 2002; TOMMERUP et al., 2003). O impacto potencial da ferrugem na Austrália não se restringe somente à biodiversidade nativa australiana, dentre os alvos em potencial destacam-se as florestas plantadas, espécies australianas ornamentais e espécies de destaque para o agronegócio australiano, como a produção de óleos essenciais (GLEN et al., 2007). O profundo conhecimento do bioclima onde a doença ocorre nas espécies de *Eucalyptus*, tem sido utilizado para predizer qual o grau de risco do estabelecimento da doença nas diferentes regiões da Austrália. Ou seja, estabelecem áreas potenciais de ocorrência da doença. A área de maior risco de estabelecimento da doença encontra-se na faixa do litoral da costa oeste do continente australiano; região característica de maior umidade relativa. Ao contrário, a área de menor risco encontra-se exatamente no cerrado australiano, devido à baixa umidade relativa e a inexistência do período mínimo de molhamento foliar inerente à doença (BOOTH et al., 2000; GLEN, 2007).

No Brasil, a *Puccinia psidii* é bem difundida, o patógeno foi reportado em cerca de 10 gêneros de mirtáceas dos 23 encontrados no país (MARLATT; KIMBROUGH, 1979; WALKER,

1983; RAYACHHETRY et al., 2001; HENNEN et al., 2005). Apesar de possuir uma ampla gama de hospedeiros, pouca informação é publicada sobre a incidência de *Puccinia psidii* na vegetação nativa do Brasil. Embora a doença não seja severa para a população nativa, com exceção das plantações de jambo, *S. jambos*, representa um problema potencial para as florestas plantadas de eucalipto, devido à importância econômica para as indústrias dependentes dessa cultura (DE GOES et al., 2004; RIBEIRO; POMMER, 2004). É um patógeno que co-evoluiu com muitos gêneros e espécies, e tem sido identificado em hospedeiros de grupos filogenéticos mais distantes. Provavelmente se deva às novas associações e proximidade com diversos hospedeiros podendo facilitar rapidamente a evolução da doença.

2.5 Fisiologia da interação planta-patógeno

2.5.1 Mecanismos de defesa vegetal

As plantas servem de fonte de alimento para os patógenos, pela sua elevada quantidade e qualidade das matérias de reserva e pela sua condição de imobilidade, tornando-se alvos perfeitos para estes organismos, altamente especializados em captar seus alimentos (LAM et al., 2001).

A relação planta-patógeno têm sido alvo de muitos estudos que visam compreender as barreiras desencadeadas e aprimoradas durante o curso da evolução para impedir a instalação de doença em plantas. Cada interação hospedeiro-patógeno pode ser encarada como uma luta entre dois organismos pela sobrevivência. De um lado, o patógeno lança mão de suas armas químicas para atacar o hospedeiro em potencial, enquanto, por outro lado, o hospedeiro através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, procura defender-se dos ataques realizados. (TAIZ; ZEIGER, 2004)

Em habitats naturais, os vegetais estão cercados por um grande número de inimigos potenciais. Pela sua natureza, as plantas não conseguem evitar os patógenos simplesmente deslocando-se, por isso, elas dispõem de algumas formas de proteção que impedem a entrada destes invasores. Os mecanismos estruturais de defesa podem ser vistos como defesa física, que evitam ou restringem o desenvolvimento da doença. Por essa razão, todas as partes do vegetal expostas à atmosfera são recobertas com material lipídico, o qual ainda auxilia, na redução da perda de água. A cutícula e o tecido suberizado são componentes importantes na exclusão de fungos e bactérias, embora não sejam essenciais na resistência a patógenos. Muitos fungos, como no caso da ferrugem do eucalipto, penetram diretamente através de células da epiderme. Outros

penetram por aberturas naturais, como estômatos por exemplo e outros ainda, utilizam-se de enzimas hidrolíticas (penetração ativa), facilitando assim a sua entrada na planta. Porém, a penetração do patógeno pode ser dificultada pelo próprio vegetal. Um bom exemplo de barreira é a lignina, uma macromolécula fenólica altamente complexa que desempenha funções protetoras. Sua estabilidade química a torna indigerível, funcionando assim como um poderoso bloqueio contra o ataque de patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Além de barreiras físicas, os vegetais lançam mão de componentes químicos para auxiliar no processo de defesa. Durante muito tempo, a importância adaptativa da maioria dos metabólitos secundários vegetais era desconhecida. Acredita-se que os mecanismos de defesa dos vegetais devam ter surgido através de mutações herdadas, seleção natural e mudanças evolutivas. As mutações aleatórias nas rotas do metabolismo primário levaram ao surgimento de novos compostos tóxicos, então utilizados como estratégia de defesa do vegetal. Os metabólitos secundários diferem dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, assim, os metabólitos secundários são restritos a uma espécie ou grupo de espécies. Já os metabólitos primários, são obrigatoriamente encontrados em todo o reino vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Os terpenos constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizadas a partir da acetil CoA ou intermediários glicolíticos. Monoterpenos e sesquiterpenos são normalmente encontrados em tricomas glandulares na superfície da planta. Acredita-se que os terpenos sejam sintetizados nas células do tricoma e armazenados em uma cabeça esférica no topo, e agem na defesa de muitos vegetais contra os herbívoros, principalmente. Alguns terpenos estão envolvidos no metabolismo primário do vegetal e podem desempenhar múltiplas funções, desde o crescimento vegetal, como as giberelinas e esteróis, assumindo assim as funções de constituição de membranas e também os carotenóides, pigmentos essenciais no complexo captador de luz e protetores contra a fotoxidação (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos produzem uma grande variedade de produtos secundários que contém um grupo fenol. É um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Dentre esse grupo de compostos fenólicos, estão presentes os isoflavonóides,

constituintes da classe dos flavonóides. Estes compostos desempenham um importante papel contra as infecções causadas por fungos e bactérias e são conhecidos pela sua ação de fitoalexinas. As fitoalexinas não estão presentes na plantas antes da infecção, mas podem ser produzidas muito rapidamente em resposta ao ataque (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os compostos nitrogenados incluem compostos como alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não protéicos. Um exemplo clássico deste composto é o ácido jasmônico, que induz à síntese de muitos genes de defesa do vegetal, a partir do seu aumento repentino, em resposta a um dano causado por herbívoros, principalmente (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.5.2 Patossistema planta-patógeno

Como hospedeiras, as plantas apresentam vários níveis de defesa que auxiliam de forma a controlar suas principais limitações causadas pela falta de um sistema de defesa circulatório e pela imobilidade.

Uma forma comum de defesa vegetal resulta no colapso localizado e programado de células vegetais, conhecido como reação de hipersensibilidade (HR) (STAKAWICZ et al., 1995). Neste tipo de reação há a produção de intermediários reativos de oxigênio, conhecido como “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO's) (HEGEDUS et al., 2001). Durante a interação planta-patógeno há produção de ERO em três fases: Na primeira fase, há o reconhecimento dos elicitores provenientes do patógeno, que podem ser carboidratos, proteínas, peptídeos, porções de glicoproteínas ou esteróis (BOLLER, 1995), reconhecidos por proteínas específicas que são denominadas de receptores de membrana, inseridas na membrana plasmática. Durante a fase seguinte, ocorre o desencadeamento da transdução de sinal, não há a identificação de sintomas visíveis. Nesse processo, o efeito em cascata leva à ativação dos genes de resposta de hipersensibilidade (HR), biossíntese de fitoalexinas, biossíntese de lignina e biossíntese de ácido salicílico, que caracterizam o processo de resistência sistêmica adquirida (RSA). Ao nível de membrana ocorre a participação de um sistema integrado e amplificador de sinalização, envolvendo proteínas de canais, no qual, o fluxo de íons promove uma mudança de potencial. Um cátion importante nesse processo é o cálcio (Ca^{+2}), ele é mantido em concentrações extremamente baixas no citossol quando ocorre a inversão da sua concentração tem-se o reconhecimento do momento de disparo do mecanismo de defesa (LAMB; DIXON, 1997). A

última fase é característica pelo aparecimento de sintomas visíveis, ou seja, o processo da evolução da doença (BAKER; ORLANDI, 1999).

O mecanismo que as plantas possuem para gerar superóxidos a partir do O_2 molecular, possivelmente envolve uma NADPH oxidase associada à membrana. Entretanto, a presença de um motivo citoplasmático no qual o cálcio se liga à NADPH oxidase vegetal, sugere a possibilidade de regulação direta da atividade dessa oxidase, através da percepção de trocas em concentrações subcelulares de cálcio (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Injúrias no tecido vegetal e processos oxidativos normais da célula são provavelmente responsáveis pela geração de O_2^- . Durante o transporte de elétrons pelas membranas das organelas como cloroplastos e mitocôndrias, muitos destes elétrons são perdidos, e então captados pelo O_2 , formando O_2^- (LESHEM, 1988, citado por GOODMAN; NOVACKY, 1994), Figura 4.

O acúmulo de ERO pode resultar em prejuízos consideráveis à célula, que dispõe de vários mecanismos de detoxificação eficiente para espécies reativas. Este mecanismo de proteção envolve a presença de importantes enzimas reguladoras, tais como: superóxido dismutases (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalases.

As catalases são as principais enzimas de detoxificação nas plantas. Convertem diretamente H_2O_2 em H_2O e O_2 e podem também oxidar substratos como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico. Estão presentes nos peroxissomos e glioxissomos onde funcionam como um canal de limpeza celular (BREUSEGEM et. al., 2001). Com relação ao patógeno, a catalase pode ser uma forma de defesa enzimática contra as ERO's do hospedeiro. Essas enzimas contidas nos perossixomos de muitos fungos dificultam a ação dos genes de defesa. Com isso, o hospedeiro não consegue reagir através da explosão oxidativa, produção de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio, na tentativa de isolar o patógeno (GARRE et. al., 1998).

Entre as várias funções da ERO no mecanismo de defesa do vegetal, podemos citar o efeito tóxico direto do H_2O_2 ao patógeno, que age como um agente antifúngico (SUTHERLAND, 1991; ALLAN; FLUHR, 1998). Para se ter um controle efetivo de resposta de defesa do vegetal, a concentração de H_2O_2 no sítio de infecção deve ser alta o bastante para agir como agente microbicida. Além da atuação no complexo e integrado sistema de sinalização celular que culminará na ativação da expressão de genes de defesa, o H_2O_2 participa das ligações cruzadas (*cross-linking*) de proteínas de parede celular formando assim um grande polímero de várias

glicoproteínas que reforça estruturalmente a parede celular e resulta em uma importante forma de barreira física (ALVAREZ et. al., 1998).

Figura 4 – Representação esquemática do desencadeamento da defesa vegetal. Os elicitores, moléculas do patógeno, são responsáveis por iniciarem o mecanismo de defesa vegetal, estas interagem com os receptores de membrana, então o processo desencadeia uma cascata de sinalização (Adaptado TAIZ; ZEIGER, 2004)

Nos últimos anos, os pesquisadores isolaram mais de 20 genes diferentes relacionados à resistência vegetal, conhecidos como genes *R*, os quais agem na defesa contra fungos, bactérias e nematóides. A maioria dos genes *R* codifica receptores protéicos, que reconhecem e se ligam a moléculas específicas derivadas dos patógenos. Essa ligação funciona como um alerta para a planta sobre a presença do patógeno. A interação é conhecida como patossistema, usualmente de alta especificidade, o qual combina os genes *R* da célula vegetal com proteínas elicitoras, *Avr* oriundas do patógeno (FLOR, 1971).

Quase todos os transcritos dos genes *R* são proteínas com domínios ricos em leucina (*LRR: Leucine Rich Repeats*), repetidos várias vezes na sequência de aminoácidos. As LRR desempenham um papel direto no reconhecimento específico proteína-proteína, ou seja, proteína do hospedeiro reconhece especificamente a proteína do patógeno, desencadeando assim, um processo denominado teoria gene-a-gene. A presença também de regiões de quinase catalítica em

alguns genes *R*, possui a função de sinalizar todo o processo de reconhecimento (RICHTER; RONALD, 2000).

Alguns produtos codificados dos genes *R* parecem estar localizados no lado de fora da membrana plasmática, onde poderiam rapidamente detectar elicitores. Outros são citoplasmáticos e detectam tanto as moléculas do patógeno quanto as mudanças metabólicas indicadores de infecção (TAIZ; ZEIGER, 2004). Um elemento inicial comum, descrito anteriormente, é a mudança transitória na permeabilidade iônica da membrana plasmática, causado pela entrada de Ca^{+2} e H^{+} na célula e a saída de K^{+} e Cl^{-} (NÜRNBERGER; SCHEEL, 2001). Os genes *R* constituem-se numa das maiores famílias gênicas nas plantas e estão freqüentemente agrupados ao genoma. A estrutura destes arranjos pode auxiliar a gerar diversidade, por promover permuta entre os cromossomos. Uma vez estabelecido que os genes *R* transcrevem proteínas capazes de identificar os genes *Avr*, elicitores, deve-se inferir que o genoma do hospedeiro é capaz de evoluir no mesmo passo em que os patógenos desenvolvem novas raças. Dessa forma, a garantia de sobrevivência da espécie está fortemente ligada às contínuas alterações sofridas pelos genes *Avr* na população dos patógenos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997)

Outra resposta de defesa à infecção é a formação de proteínas que hidrolisam a parede celular do fungo. Essas enzimas ricas em quitinases, glucanases e outras hidrolases pertencem ao grupo de proteínas relacionadas à infecção do patógeno, que as plantas produzem na tentativa de barrarem o avanço dos mesmos. Essas proteínas são denominadas de proteínas relacionadas à patogênese (*PR proteins*). As PR's proteínas são divididas em 5 grupos: PR-1, proteínas de resistência; PR-2 e PR-3, possuem ação enzimática, glucanases e quitinases, respectivamente; PR-4, possuem atividade biológica ainda desconhecida e PR-5 que podem inibir enzimas digestivas que decompõem proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Desta maneira, a infecção por *Puccinia psidii* pode ser considerada como uma séria ameaça às espécies de eucalipto nos tempos atuais. A doença não co-evoluiu com o hospedeiro e por essa razão, torna-se um elemento potencial a vencer as barreiras impostas pelo hospedeiro. Medidas como a quarentena são necessárias para prevenir a entrada deste fungo nos países onde ela ainda não ocorre naturalmente. Também um detalhado estudo taxonômico é necessário a fim de se determinar o total de hospedeiros além da distribuição geográfica do *P. psidii*.

2.6 O proteoma aplicado no estudo da interação planta-patógeno

O proteoma é o conjunto de todas as proteínas do genoma de um organismo. O proteoma celular é muito complexo, formado por um grande número de proteínas que variam de acordo com o momento ou evento metabólico ao qual está submetido o organismo (WASIGNER et al., 1995; WILKINS et al., 1995; LOPEZ, 1999). O estudo em larga escala desse conjunto de proteínas é conhecido como proteômica e envolve o isolamento sistemático, a identificação, a quantificação e o seqüenciamento das proteínas de uma determinada célula ou tecido, bem como seu estado de ativação, interação, alteração e suas propriedades (ANDERSON et al., 1997). Como os níveis de mRNA nem sempre são diretamente correlacionados ao número exato de proteínas, a identificação de modificações pós-traducionais podem ser peças chaves para o entendimento do real mecanismo de regulação celular (GYGI et al., 1999). As modificações que não são aparentes na seqüência do genoma, como isoformas e modificações pós-tradução, porém extremamente importantes e muitas vezes necessárias para determinar a função, atividade, estabilidade, localização e turnover da proteína e podem ser determinadas pela proteômica. Entre as modificações pós-tradução mais de 283 exemplos são conhecidas (GARAVELLI et al., 2001), porém, ainda muitas são esperadas. Identificar o tipo de modificação e a sua localização freqüentemente fornece informações cruciais para compreender a função e a regulação de uma certa proteína em uma rota metabólica (KRISHNA; WOLD, 1993).

O sistema mais comum de análise é realizado por eletroforese que separam as proteínas de acordo com seu peso molecular ou de acordo com seu ponto isoeletrico (KINTER; SHERMAN, 2000). Técnicas de separação de proteínas por eletroforese multidimensional vêm sendo aplicadas desde a década de 50, porém a origem do método da eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE) utilizada em trabalhos com proteômica é mais recente. Os protocolos que envolvem uma seqüência lógica de focalização isoeletrica e separação por eletroforese bi-dimensional aplicados à proteômica foram desenvolvidos em meados da década de 70, por Patrick O' Farrell, em análise de proteínas de *Escherichia coli*. As proteínas são separadas de acordo com sua habilidade de se mover sob a influência de um campo elétrico e para tal, devem estar saturadas. Dessa forma, são solubilizadas numa solução tampão contendo detergente, comumente dodecilsulfato de sódio (SDS) que promove um efeito de interação uniforme. Assim, as proteínas adquirem carga negativa com magnitude proporcional ao tamanho da molécula. O fato de todas as moléculas de proteínas estarem carregadas negativamente significa que o movimento se dará apenas em uma

única direção, avançando contra o pólo positivo. Um segundo efeito do SDS é que também desnatura e lineariza as proteínas facilitando o movimento da mistura de proteínas de acordo com seu peso molecular através da malha de poros do gel de acrilamida. Assim proteínas pequenas movem-se mais rapidamente do que proteínas maiores (KINTER; SHERMAN, 2000).

Os géis 2D-PAGE são vantajosos uma vez que conferem uma visão global do proteoma de um determinado tecido e permitem a pré-separação das proteínas da amostra por ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (PM). Um importante aspecto do 2D-PAGE é o uso de gradientes imóveis de pH (IPG's), onde um gradiente de pH é fixado em uma matriz de poliacrilamida. IPG também possibilita a produção de géis que cobrem diversas faixas de pH, tornando assim mais específica a análise das proteínas ou grupos de proteínas (LANGEN et al., 2000; HOVING et al., 2002). Atualmente, sistemas padronizados de 2D-PAGE permitem a análise de cerca de 2.500 *spots* de proteínas, ou mais, como é o caso do proteoma de organismos eucariotos com ordens de magnitude maiores. (TWYMAN, 2004).

O uso da espectrometria de massas por muito tempo ficou restrito a um pequeno número de moléculas capazes de resistir ao método de ionização e ao processo de análise que envolve a sua transferência para um sistema de alto vácuo e altas temperaturas, sendo um obstáculo no estudo de biomoléculas. No anos 80, com o desenvolvimento de novos métodos de ionização branda, o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) (KARAS, 1987) e o ESI (*Electrospray Ionization*) (FENN, 1987), ocorreu uma revolução na análise de biomoléculas, pelo fato de possibilitar a ionização de macromoléculas fora de um ambiente aquoso, até então biologicamente impossível.

Um estudo realizado para identificar proteínas diferentemente reguladas em resposta à interação entre o fungo *Fusarium graminearum* e o hospedeiro *Triticum aestivum*, detectou que o maior grupo de proteínas em resposta à infecção primeiramente recrutadas são as de respostas à defesa, as quais incluem: proteínas encontradas na rota da “explosão oxidativa”, proteínas de rotas sinalizadoras e as PR-proteínas. Dessas, três, as proteínas, ascorbato peroxidase, glutathione transferase e osc40c1, possuem funções antioxidativas (ZHOU et al., 2006). Todas as proteínas antioxidantes detectadas são importantes para a proteção da própria célula do hospedeiro contra as espécies reativas de oxigênio produzidas por ele mesmo e pelo fungo. Neste mesmo trabalho, os autores observaram evidências indiretas de que a rota da “explosão oxidativa” foi induzida pelo *F. graminearum* e esta linha de defesa foi ativada mesmo antes de completar 24 horas após a

inoculação. Proteínas envolvidas na rota de sinalização também foram encontradas nos géis do tratamento de inoculação do fungo. Os autores identificaram proteínas reguladoras para o ácido jasmônico e ácido salicílico (ZHOU et al., 2006).

Outro estudo realizado com trigo analisou o proteoma das folhas infectadas por *Puccinia triticina*, causadora de ferrugem. De acordo com Ramptische colaboradores (2006), as mudanças mais visíveis no proteoma durante a progressão da doença aconteceu após o 6º dia de infecção. Os sintomas começaram a ser visíveis na transição do 5º para o 6º dia e se tornaram claramente visíveis no 9º dia. Na planta susceptível, 7 proteínas de resposta do hospedeiro foram detectadas por 2D-PAGE, sendo que 2 dessas proteínas já tinham sido identificadas por Ventelon-Debout et al. (2004) na interação com vírus em plantas de arroz. Dessas duas, uma isoforma foi observada por Campo et al. (2004) em milho resultante da infecção com fungo. Os autores observaram ainda um aumento no nível de síntese de proteínas nos estágios iniciais da associação do fungo biotrófico. Por outro lado, no caso dos peptídeos isolados do fungo, observou-se mudanças nas enzimas metabólicas (p.ex. carboidrato quinase), proteínas estruturais (p.ex. α -tubulina e proteínas ribossomais) e proteínas com papel de patogenicidade (p.ex. *heat shock proteins* e *14-3-3-like proteins*). Esta última categoria desempenha um papel de proteção do fungo contra o estresse gerado pelo mecanismo de defesa dos hospedeiros.

O número de estudos relacionados à expressão gênica do fungo (*Puccinia* spp) é pequeno. Contudo, Zhang et al. (2003) e Thara et al. (2003) identificaram mais de 75 clones de cDNA que codificam proteínas fúngicas como resultado da interação entre folha de trigo e fungo, que incluem proteínas ribossomais, tubulinas, biossíntese da enzima tiazole, *heat shock proteins*, além de proteínas com funções ainda desconhecidas.

Na cultura da soja (*Glycine max*), a ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) é uma doença de grande impacto econômico e social. Primeiramente relatada no Japão em 1902, a doença entrou no cenário brasileiro no final da safra 2000/01 no Estado do Paraná (YORINORI et al., 2002a). De acordo com levantamento concluído pela EMBRAPA, a ferrugem asiática provocou perdas de cerca de 4,5 milhões de toneladas de soja, na safra 2004/05. Considerando-se o que deixou de ser colhido e os gastos com o controle químico (fungicidas e despesas com aplicação), o custo foi de aproximadamente US\$ 2 bilhões. Com o aparecimento dessa nova doença no Brasil realizaram-se testes para identificação de resistência à doença. Existem relatos de genes dominantes para resistência, denominados Rpp1 a Rpp4, identificados em introduções

de plantas e cultivares. No entanto, a estabilidade dessa resistência é duvidosa, devido à grande variabilidade do patógeno (HARTMAN et al., 1994). Dados de um estudo realizado pelo *Asian Vegetable Research and Development Center* (AVRDC), Taiwan et al (1985) sugerem que as raça predominantes de ferrugem são complexas e essas raças possuem genes de avirulência (*Avr*) múltiplos para compatibilidade na maioria das linhagens.

Os maiores avanços na produção de plantas resistentes a doenças está no reconhecimento e detalhamento preciso dos mecanismos de interação planta-patógeno (patossistema). Em breve, novas tecnologias de genômica, transcritômica, proteômica e metabolômica poderão auxiliar na identificação de componentes sinalizadores e na investigação das funções bioquímicas das proteínas R (*R proteins*), além de outras moléculas sinalizadoras. O surgimento de novas ferramentas como a bioinformática, pode, de forma direta, realizar análises computacionais e integração de bancos de dados a fim de identificar genes envolvidos na interação planta-patógeno. A chamada tecnologia *highthroughput*, incluindo o aperfeiçoamento da técnica e reprodutibilidade dos géis 2D PAGE, além da identificação detalhada da espectrometria de massas, poderão assistir na análise de proteínas diferencialmente expressas, modificações pós-traducionais, como a fosforilação e glicosilação, durante a interação planta-patógeno. Essas investigações contribuirão significativamente para o nosso entendimento do mecanismo de reconhecimento do patossistema e também, a compreensão da complexa rede de sinalização mediada na ativação da resposta de defesa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Multiplicação dos uredósporos de *Puccinia psidii* Winter

Os uredósporos de *Puccinia psidii* foram coletados a partir de material vegetal no campo e as mudas de *Eucalyptus grandis* foram gentilmente cedidos pela SUZANO PAPEL E CELULOSE. As folhas, provenientes do campo, tiveram somente a área de suas pústulas raspadas com auxílio de lâmina cirúrgica. Os uredósporos foram coletados em placa de Petri aos quais adicionou-se 200 mL de água Milli-Q acrescida de 0,5% (v/v) de tween 20. A solução de uredósporos permaneceu sob agitação branda por 2 minutos em agitador magnético. Em seguida, foi transferida para pulverizador manual e aspergida sob ambas as faces das folhas das mudas, mantidas em tubetes. As mudas utilizadas como multiplicadoras dos uredósporos, é um material vegetal (M09D1), proveniente de sementes e são classificadas como suscetíveis, escala S3.

Com as folhas totalmente saturadas com a solução de uredósporos aspergida, as mudas foram mantidas em câmaras de crescimento (CONVIRON E15) no escuro por 24 horas sob temperatura constante de 19 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$), de acordo com o esquema da Figura 5. A umidade foi mantida no ponto de saturação com o auxílio de um saco plástico transparente, utilizado para cobrir as mudas. Após um período de 24 horas, as mudas foram submetidas a iluminação com regime de fotoperíodo de 12 horas luz ($170 \mu\text{mol}$ s de fótons fotossinteticamente ativo $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e 12 horas escuro. Passado esse período total de 48 horas após a inoculação, os sacos plásticos foram abertos durante o período de luz e fechados no período de escuro. As mudas foram irrigadas duas vezes ao dia com água e solução nutritiva comercial (2g/L), tomando-se cuidado de não molhar as folhas inoculadas.

3.2 Coleta dos uredósporos de *P. psidii* e Inoculação do material vegetal

Os sintomas da doença começaram a aparecer entre o 5º e 6º dia após a inoculação. No 9º dia após inoculação as mudas apresentaram uma carga satisfatória de uredósporos. Os uredósporos do material M09D1, suscetível, foram coletados com auxílio de lâmina cirúrgica. Somente a área das pústulas foram raspadas e os uredósporos coletados em placa de Petri. Aos uredósporos adicionou-se 250 mL de água acrescida de 0,5% (v/v) de tween 20, deixados sob agitação magnética branda por 2 minutos. A contagem dos uredósporos foi feita com o auxílio de câmara de Neubauer e um total de $5,3 \times 10^5$ uredósporos/mL foi utilizado para a inoculação.

As mudas caracterizadas como mudas resistentes (clone 7) e mudas suscetíveis (clone 24), apresentavam idades semelhantes, com cerca de 90 a 100 dias.

Um total de 100 mudas de cada clone, 7 e 24, foram acomodadas em uma câmara de crescimento (C1) e sob estas mudas foram aspergidos 250 mL de água Milli-Q acrescida de 0,5% (v/v) de tween 20, sem uredósporos. As plantas da câmara C1 foram consideradas como controles do experimento. Desta forma, obtivemos mudas resistentes sem inoculação de uredósporos (CR) e mudas suscetíveis sem inoculação de uredósporos (CS).

Em uma outra câmara de crescimento (C2) acomodou-se um total de 400 mudas, 200 do clone resistente e 200 do clone suscetível. De maneira uniforme, 250 mL da solução contendo uredósporos ($5,3 \times 10^5$ uredósporos/mL) foi aspergida em ambas as faces das folhas dos clones. Assim, na C2 analisamos os clones resistentes inoculados com uredósporos (IR) e clones suscetíveis inoculados com uredósporos (IS).

Em ambas as câmaras de crescimento, C1 e C2, as mudas foram cobertas independentemente com sacos plásticos transparentes para manter a umidade satisfatória na superfície foliar, então mantidas no escuro por 24 horas à 19°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Decorrido esse período, as mudas foram submetidas à luminosidade com regime de fotoperiódico de 12 horas de luz ($170 \mu\text{mol}$ de fótons fotossinteticamente ativos $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e 12 horas de escuro, Figura 6. Em seguida, as mudas foram descobertas durante o período de luz e cobertas durante o período de escuro, sendo irrigadas duas vezes ao dia com água e solução nutritiva comercial (2g/L), tomando-se o cuidado de não molhar as folhas inoculadas.

Figura 5 – Multiplicação dos uredósporos de *P. psidii* em material suscetível (M09D1). A) Folhas de *Eucalyptus grandis* infectadas naturalmente, proveniente do campo. B) Raspagem dos sítios dos soros e coleta em placa de Petri. C) Aspersão da solução de uredósporos sobre as folhas do material M09D1

Figura 6 – Esquema de coleta dos uredósporos do material M09D1 e inoculação nos clones 07 e 24. A) Material suscetível M09D1. B) Pústulas de uredósporos de *P. psidii*. C) Coleta dos uredósporos no sítio de infecção. D) Aspersão da solução de uredósporos sob os clones resistente (07) e suscetível (24)

3.3 Coleta do material vegetal

Foram coletadas apenas folhas jovens do terço superior de cada clone, resistente e suscetível. Os tempos de coletas foram estabelecidos como: 1º tempo de coleta - 24 horas após a inoculação; 2º tempo de coleta - 6 dias após a inoculação; 3º tempo de coleta - 12 dias após a inoculação.

Para cada tempo estabelecido, os materiais foram coletados aleatoriamente dentro do mesmo clone e marcados com auxílio de fita adesiva. As coletas foram iniciadas pelo controle, seguindo-se para o tratamento inoculado. As folhas jovens do terço primário dos clones foram cortadas com auxílio de tesoura na junção entre o limbo foliar e o pecíolo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e mantidas isoladamente a -80°C.

Tabela 1 – Nomenclatura dos tratamentos estabelecidos dentro dos tempos de coletas determinados para os clones resistente e susceptível

Coletas	Clone Resistente		Clone Susceptível	
	Controle	Inoculado	Controle	Inoculado
24 horas	CR24h	IR24h	CS24h	IS24h
6 dias	CR6D	IR6D	CS6D	IS6D
12 dias	CR12D	IR12D	CS12D	IS12D

3.4 Extração das proteínas das folhas de eucalipto

3.4.1 Pré-lavagem do material vegetal

Para a pré-lavagem utilizou-se a metodologia de extração ácida de Damerval et al. (1986). Cerca de 2,0 g de tecido foliar de cada tratamento descrito acima foram macerados em nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para tubos de centrífuga (NALGENE) de 30 mL contendo

25 mL de uma solução com 10% (p/v) de TCA em acetona 100% acrescida de 0,07% (v/v) de 2-mercapetanol mantida a -20°C. Os tubos foram invertidos e imediatamente acondicionados a -20°C por 1 hora. Decorrido esse período, os tubos foram centrifugados (16.000 g) por 20 minutos a 2 °C. O sobrenadante foi descartado, adicionando-se ao *pellet* 25 mL de acetona 100% acrescida de 0,07% (v/v) de 2-mercaptoetanol gelada (-20°C), tomando-se o cuidado para não desfazer o *pellet*. Os tubos foram então mantidos a -20°C, por uma hora, antes de serem centrifugados (16.000 g) por 20 minutos a 2°C. Decorrido o período da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* resultante foi seco em dissecador em câmara fria (4°C) até a evaporação completa da acetona.

3.4.2 Extração fenólica das proteínas das folhas de eucalipto

Para a extração fenólica utilizou-se a metodologia de Hurkman e Tanaka (1985). Ao *pellet* seco resultante da pré- lavagem do material vegetal, adicionou-se 15 mL de tampão de extração composto de 1% PVPP (p/v); 50 mM de EDTA (p/v); 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5; 0,7M de sacarose; 2% (v/v) 2-mercaptoetanol e 1 mM de PMSF. Após 30 minutos de homogeneização por agitação constante no gelo, acrescentou-se à amostra um volume igual de fenol saturado em Tris pH 8.5, seguido de mais 30 minutos de homogeneização nas mesmas condições. O material foi então centrifugado por 30 minutos a 10.000 g a 4°C, e a fase fenólica transferida para um novo tubo. Na fração fenólica recuperada adicionou-se um volume igual de tampão de extração e em seguida um volume igual de fenol sendo então a amostra homogeneizada por 30 minutos a cada acréscimo. As extrações foram seguidas de centrifugação sob as condições anteriores. Esse procedimento foi repetido 3 vezes, até que todos os resíduos fossem visivelmente removidos da fase fenólica. As proteínas da fração fenólica recuperadas na última extração foram precipitadas *overnight* a -20°C pelo acréscimo de 7 volumes de 0.1 M de acetato de amônio em metanol 100%. Em seguida os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 10.000 g a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* recuperado foi lavado 2-3 vezes com 0.1 M de acetato de amônio em metanol 100% (-20°C) e 1 vez com acetona 100% gelada (-20°C). A cada etapa, as proteínas foram precipitadas por 30 minutos a -20°C e recuperadas por centrifugação sob as mesmas condições anteriores. O *pellet* final foi seco em dissecador a 4°C em câmara fria.

3.5 Solubilização das proteínas extraídas

O *pellet* seco foi ressuspendido em uma solução contendo: 7M Uréia; 50mM DTT; 0,4% Triton X-100; 1% IPG Buffer; 2% CHAPS; 2M Tiouréia.

3.6 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se um *kit* comercial de quantificação de proteínas da BioRad (*Protein Assay*). Alíquotas de 1 a 15 μ L da amostra, juntamente com 3,5 mL do corante diluído (3:1), foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, tendo suas absorbâncias determinadas a 595 nm em um espectrofotômetro. As concentrações das proteínas foram calculadas através da comparação com uma curva-padrão de proteínas de albumina de soro bovina como padrão.

3.7 Focalização isoeletrica (IEF)

As amostras de proteínas foram separadas utilizando-se fitas IPG de 17 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7 (BioRad). As fitas IPG foram reidratadas ativamente a 30 V, durante 12 horas a 20°C no aparato de focalização isoeletrica com 375 μ L de tampão (7 M Uréia; 2 M Tiouréia; 10 mM DTT; 0,4% (v/v) Triton X-100; 2% (v/v) CHAPS; 1,0 % Anfólitos e 0,005% (p/v) azul de bromofenol). Sobre as fitas IPG acrescentou-se 1,0 mL de óleo mineral (*Fluid Cover, Amersham Biosciences*).

A focalização isoeletrica foi realizada nas seguintes condições: reidratação ativa de 30 V por 12 horas, 200V por 1 hora; 500 V por 1 hora; 1.000 V, por uma hora e 5.000 V até atingir 75.000 V.h. Após a focalização, as fitas foram lavadas com água Milli-Q e armazenadas a -80°C. Posteriormente, as fitas IPG foram mantidas por 15 minutos em solução de equilíbrio e redução [50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Uréia; 30% (v/v) Glicerol; 2% (p/v) SDS; 130mM DTT]. Transferidas e mantidas por 15 minutos em solução de alquilação [50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Uréia; 30% (v/v) Glicerol; 2% (p/v) SDS; 135 mM Iodoacetamida e 0,005% (p/v) de azul de bromofenol].

3.8 Eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE)

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em um gel vertical homogêneo de 12,5% (p/v) de acrilamida (180 x 160 x 0,75 mm), conforme Laemmli (1970). O gel foi

preparado com 12,5% Acrilamida/Bis; 0,5 M Tris/HCl pH 8,8; 5,5% (p/v) persulfato de amônio e 0,075% (v/v) TEMED. Depois de equilibradas, reduzidas e alquiladas, as tiras foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida [25 mM Tris-HCl; 192 mM glicina; 0,1% (p/v) SDS]. A separação eletroforética das proteínas foi realizada a 10°C, em uma cuba modelo *PROTEIN II XI 2-D Cell* (BioRad). No primeiro estágio utilizou-se uma amperagem fixa de 16 mA por gel por 30 minutos e no segundo estágio, utilizou-se uma amperagem fixa de 24 mA por gel durante aproximadamente 3 horas. Após a eletroforese, os géis foram lavados com água Milli-Q por 5 minutos e corados com solução de coloração *Coomassie Brilliant Blue G 250*, realizada segundo o protocolo de Candiano et al. (2004). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, conforme descrito a seguir. Os géis foram submetidos por 60 minutos a uma solução fixadora [40% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético], lavados duas vezes com água Milli-Q e mantidos por 12 horas em solução de coloração [0,1% (p/v) *Coomassie Brilliant Blue G 250*, 10% (v/v) ácido ortho-fosfórico, 10% (p/v) sulfato de amônio, 20% (v/v) metanol]. Depois de corados os géis foram lavados em água Milli-Q até a completa remoção excedente do corante.

3.9 Obtenção e análise das imagens dos 2D-PAGE

As imagens das proteínas separadas pela eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e coradas com *Coomassie Brilliant Blue G 250* foram obtidas por meio de *scanner*. As análises dos géis foram realizadas pelo programa *Image Master Elite v. 3.01* (Amersham Pharmacia Biosciences). A detecção dos *spots* e a determinação de seu volume foi realizada de modo automático. As correções foram realizadas com a adição e remoção manual dos *spots*. As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas utilizando-se padrões de massa molecular (*Brod Range- Molecular Weight Marker*, Bio-Rad).

3.10 Determinação dos carboidratos da parede celular em tecido foliar de plantas de eucalipto via HPAE-PAD

3.10.1 Quantificação das hemiceluloses

Para a determinação via HPAE-PAD do conteúdo das hemiceluloses e ácidos urônicos (ácido galacturônico e ácido glucurônico) da parede celular de folha dos clones resistentes e suscetíveis de eucalipto, aproximadamente 500 mg de tecido foliar foram coletados e macerados

em cadinhos de porcelana sob N₂ líquido com auxílio de um pistilo. A amostra foi transferida para tubos tipo *Falcon*TM (15 mL), a lavagem para a remoção dos extrativos e componentes não estruturais foi realizada pela adição de 10 mL de etanol 80% (v/v). Os tubos foram então, mantidos em banho-maria por 50 minutos a 80°C. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2.348 g. Esse processo de lavagem foi repetido por mais quatro vezes. Para a remoção de resíduos de amido adicionou-se uma solução de DMSO (dimetilsulfóxido) 90% (v/v), com incubação a 30°C por 24 horas, após este período o material foi lavado mais três vezes com água Milli-Q de acordo com a metodologia descrita por Selvendran e O'Neill (1987). Ao término das lavagens, o material foi liofilizado por 48 horas até completa secagem do resíduo de parede celular.

Para a hidrólise das hemiceluloses adotou-se a metodologia de Dubois et al (1956). Pesou-se aproximadamente 5 mg do resíduo de parede celular, transferindo para um tubo *ependorf* (2 mL), ao quais adicionou-se 1,5 mL de 2 mol/L de TFA (ácido trifluoroacético). Após homogeneização, os tubos foram mantidos em autoclave a 120°C e 15 psi por 90 minutos. Em seguida as amostras foram resfriadas em banho de gelo, e centrifugadas por 10 minutos a 5.435 g. Uma alíquota (1 mL) do sobrenadante foi submetida à secagem a vácuo a 30°C por 12 horas no concentrador (*concentrator 5301*, Eppendorf) para completa remoção do TFA, o *pellet* restante foi reservado para a quantificação da celulose. O precipitado resultante da secagem do sobrenadante no concentrador (*concentrator 5301*, Eppendorf), foi ressuspenso em 1 mL de água Milli-Q e injetado no HPAE-PAD para a quantificação das hemiceluloses e ácidos urônicos da parede celular do tecido foliar.

3.10.2 Quantificação de celulose

Para a realização da hidrólise da celulose em amostras de tecido foliar dos clones de eucalipto, resistentes e suscetíveis, foi adotada a metodologia segundo TAPPI T249 cm 85 (1991) e ASTM E 1758-01 (2001). O *pellet* contendo o resíduo microfibrilar, foi seco a vácuo em temperatura de 30°C por 10 horas em concentrador (*concentrator 5301*, Eppendorf) até completa remoção do TFA, e posteriormente lavado com água Milli-Q cinco vezes até total remoção dos resíduos de hemiceluloses. Ao término da lavagem, o *pellet* foi submetido novamente à secagem a vácuo. Ao *pellet* adicionou-se 200 µL de H₂SO₄ 72% padronizado (24 N, densidade de 1,6338g/cm³ à temperatura de 10°C) de acordo com as normas TAPPI T222 om-88 (1996). Logo

após a adição do H_2SO_4 72%, as amostras foram mantidas por 1 hora a 30°C , sob agitação com bastão em intervalos de 15 minutos. Após este período adicionou-se à amostra 1,5 mL de água Milli-Q, diminuindo-se a concentração do ácido sulfúrico para aproximadamente 6 %. As amostras foram submetidas a um processo de autoclavagem (120°C , 15 psi) por 1 hora, seguido de resfriamento em banho de gelo, para completa paralisação do processo de hidrólise. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante final que contém a glicose proveniente da quebra da celulose foi injetado no equipamento HPAE-PAD.

3.11 Parâmetros do HPAE-PAD para análise dos carboidratos

3.11.1 Parâmetros utilizados para a quantificação dos carboidratos hemicelulósicos e celulósicos

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação das amostras tratadas com TFA e H_2SO_4 72% foram utilizados para a quantificação do conteúdo de monossacarídeos via HPAE-PAD, de acordo com Bragatto (2007).

As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construída de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Galactose, D-Glicose, D-Xilose e D-Manose (Sigma[®]), utilizando-se a L-Fucose como padrão interno. Para a quantificação de celulose utilizou-se D-Glicose como padrão com a utilização do fator de correção 0,9. Essas determinações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex[®] equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste utilizado foi H_2O Milli-Q e o eluente de limpeza foi de 200mM de NaOH, com fluxo de 1 mL min^{-1} , pressão no sistema de aproximadamente 2500 psi. O eluente de pós-coluna utilizado foi 300 mM de NaOH com pressão de gás nitrogênio externo de 20 psi. As amostras foram injetadas com volume de 25 μL determinado pelo *loop* de amostragem. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250 mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50mm), e o detector amperométrico associado ao eletrôdo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100mV (0 a 200ms), +100mV de integração (200 a 400ms), -2000mV (410 a 420ms), +600mV (430ms) e -100mV (440 a 500ms).

3.11.2 Parâmetros utilizados para quantificação dos ácidos urônicos

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação das amostras de tecido foliar após o tratamento com TFA foram utilizados para a quantificação do conteúdo de ácidos urônicos via HPAE-PAD de acordo com a metodologia descrita por Bragatto (2007). Para a quantificação dos ácidos urônicos, construiu-se uma curva de concentração para cada ácido urônico de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: ácido D-Glucurônico (Sigma[®]) e ácido D-Galacturônico (Fluka[®]). O mesmo equipamento descrito acima foi utilizado para essas determinações. Entretanto, para as separações dos ácidos urônicos o eluente de arraste foi uma mistura de 100mM de NaOH com 150mM de NaOAc, e o eluente de limpeza foi 200mM de NaOH com fluxo de 1 mL.min⁻¹, e uma pressão de aproximadamente 2500 psi. As amostras foram injetadas com volumes de 25 µL determinado pelo *loop* e a coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50mm).

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SAS (2000) e o nível de significância estatística estabelecido como $p < 0,05$. O teste de Dunnett de comparação de médias foi o teste utilizado para as comparações da composição química da parede celular das folhas de eucalipto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Instalação do experimento

Os clones resistentes e suscetíveis foram mantidos em bandejas em câmaras de crescimento, sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo conforme discutido no item 3.2 de Material e Métodos. No interior das câmaras instalou-se um sensor de umidade relativa para monitoramento contínuo da UR. A umidade relativa no interior das câmaras de crescimento oscilou pouco, devido ao seu sistema de circulação de ar interna o que evita a captação de ar externo, criando uma atmosfera de umidade apropriada. Como já descrito por Ruiz et al. (1989) atmosferas com valores de teores de umidade acima de 90% favorecem o processo de infecção da *Puccinia psidii*. O ambiente úmido garante que as folhas permaneçam com a superfície foliar adequadamente saturada com água, denominado molhamento foliar, isso favorece a germinação do uredósporo da ferrugem e conseqüentemente a penetração através da epiderme.

Após aspersão uniforme da solução de uredósporos sob as superfícies abaxial e adaxial observou-se na transição do 5º/6º dia após a inoculação os primeiros sintomas da doença. Exatamente nesse período, pequenos halos proeminentes tornaram-se macroscópicos, sintoma característico da ferrugem do eucalipto. O clone caracterizado como resistente permaneceu sem sintomas visuais enquanto o clone caracterizado como suscetível apresentou sintomas visuais claros. Ambos os clones permaneceram dispostos lado a lado, sob as mesmas condições ambientais. No 9º dia as pústulas desenvolvidas em ambas as superfícies foliares começaram a apresentar uma massa pulverulenta de coloração amarelo ouro intenso, característica dos uredósporos. Nos dias subseqüentes, a doença evoluiu e as plantas já apresentavam aumento das pústulas em tamanho e quantidade. A partir do 12º dia após a inoculação, o sintoma característico da ferrugem pôde ser observado também no meristema e ramos dos clones suscetíveis, indicando que a inoculação dos uredósporos foi efetiva, como observado na Figura 7.

Figura 7 – A) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) 24 horas após inoculação dos uredósporos. B) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) 6 dias após inoculação dos uredósporos. C) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) 9 dias após a inoculação dos uredósporos. D) Aspecto geral do clone suscetível 12 dias após inoculação dos uredósporos. E) Folha do clone suscetível após 12 dias de inoculação dos uredósporos. F) Comparação entre as folhas jovens do clone resistente (superior) e suscetível (inferior) que não foram expostas aos uredósporos, 12 dias após a aspersão da solução de água com Tween 20

O processo de infecção da ferrugem no eucalipto é particularmente um processo de difícil obtenção em laboratório, uma vez que a doença requer a conjugação de dois fatores ambientais, temperaturas amenas e alta umidade relativa. Nos cultivos comerciais de eucalipto do Sudeste, particularmente, esse ambiente propício é encontrado mais facilmente à noite. A maior frequência de ocorrência da doença em São Paulo se dá na época do inverno, porém esta estação é muito seca, por isso, a doença só encontra um ambiente adequado quando ocorre maior condensação de água nas folhas, temperatura amena e ausência de luminosidade, este último é muito importante para a germinação dos uredósporos. Na presença de luz pode ocorrer alta taxa de mortalidade dos uredósporos em decorrência dos raios ultravioleta.

4.2 Coletas do material vegetal

As coletas das folhas dos clones resistentes e suscetíveis dentro dos padrões estabelecidos de 24 horas, 6 dias e 12 dias após a inoculação representaram três períodos distintos do ciclo da doença. Na primeira coleta realizada com 24 horas após a aspersão da solução de uredósporos

sobre à superfície foliar de clones de eucalipto, Xavier (2001) observou que este intervalo de tempo é necessário para que possa ocorrer a ativação de uma resposta de HR por parte do vegetal. No trabalho descrito pelo autor, tanto em genótipos resistentes (UFV-2) como suscetíveis (UFV-1), 90% dos uredósporos, nas primeiras 6 horas de inoculação, formam a estrutura de penetração denominada apressório. Após a penetração, a hifa infecciosa aumenta de tamanho formando uma vesícula sub-epidérmica, da qual irá desenvolver-se a hifa primária e secundária. A célula mãe do haustório desenvolve-se a partir da hifa primária e entra em contato com a parede celular. O haustório penetra pela parede celular das células do mesofilo, torna-se uma estrutura lobulada com ramificações que ocupam grande parte do lúmen celular, sem que haja rompimento da membrana plasmática do vegetal. A formação do haustório foi observada 18 a 24 horas após a inoculação tanto nos genótipos resistentes quanto nos suscetíveis. Diferenças histopatológicas entre os genótipos não foram observadas na fase de pré-penetração. Contudo, apenas para o genótipo resistente observou-se grande acumulação de compostos nas células adjacentes às células que apresentaram haustório, indicando a presença de morte celular programada como proposto por Niks (1983). A presença macroscópica da reação de hipersensibilidade nas folhas do genótipo resistente ocorreu após 48 horas da inoculação. Xavier (2001) discute que a principal diferença entre o genótipo resistente e suscetível está justamente na velocidade do processo de infecção. Nesse caso, o genótipo resistente, antes de dois dias, foi possível observar-se HR na superfície das folhas, como resultado da ativação do metabolismo oxidativo. Já quando o autor observa o genótipo suscetível encontra uma maior morosidade no período de desenvolvimento intracelular do fungo e é só após o 3º dia de inoculação que a hifa primária se ramifica e coloniza rapidamente o tecido foliar. Assim, os primeiros sintomas visuais do genótipo suscetível começam a aparecer entre o 3º e 5º dias após inoculação, e somente após o 6º dia de inoculação os pontos de esporulação tornam-se visíveis. No nosso trabalho, o comportamento dos genótipos resistentes e suscetíveis foi muito parecido aos descritos por Xavier (2001), indicando que com 24 horas após a inoculação dos uredósporos a ativação de defesa vegetal é bem avançada.

Durante a invasão do hospedeiro, o patógeno libera moléculas não específicas, que por sua vez são reconhecidas por receptores. Essas moléculas exógenas e/ou endógenas são denominadas de elicitores. Fragmentos de elicitores oligoméricos ou monoméricos provenientes da cutícula e parede celular são os principais responsáveis pelo reconhecimento e ativação dos mecanismos de defesa no apoplasto vegetal (HÜCKELHOVEN, 2007). O entendimento

completo da interação elicitor-hospedeiro é pouco conhecido e o papel principal tem sido atribuído às quinases associadas à parede, as quais são parecidas com receptores e estão diretamente envolvidas com o crescimento celular e a tolerância à toxicidade do ácido salicílico (HE et al., 1998; KOHORN et al., 2001; KOHORN et al., 2006). Esses receptores estão associados às estruturas das pectinas e proteínas da parede celular e que apresentam domínios ricos em seqüências de glicina. Essas estruturas características as tornam candidatas para a proteção da parede celular bem como auxiliam a comunicação entre o meio externo e o citoplasma celular (KOHORN et al., 2001).

4.3 Extração das Proteínas

O método empregado para a extração das proteínas das folhas dos clones resistentes e suscetíveis resultou numa combinação de duas metodologias bem definidas. A extração fenólica foi realizada utilizando-se o macerado seco resultante da pré-lavagem do material vegetal com TCA. O resultado foi uma extração mais limpa, com baixo conteúdo de impurezas próprias do tecido foliar. Nas folhas do eucalipto muitos compostos interferentes podem ser encontrados. Um exemplo destes compostos é sua epiderme espessada por deposição de material graxo. Outros interferentes para extração de proteína, muito comuns, são vesículas de óleos essenciais encontradas no parênquima paliçádico de suas folhas. Como as folhas são fonte produtoras de energia, os pigmentos encontrados nesse tecido dificultam a obtenção de um extrato puro de proteínas. Alfenas (1998) relata também que um dos problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença abundante de compostos fenólicos liberados no momento da maceração do tecido. Os fenóis, quando descompartimentalizados, são prontamente oxidados por enzimas do próprio vegetal (polifenoloxidasas e peroxidases). Tanto os fenóis oxidados assim como os não oxidados reagem inativando enzimas e dificultando a mobilidade das proteínas. Com objetivo de anular o esse efeito, utilizou-se nos tampões de extração das proteínas agentes anti-oxidante como 2-mercaptoetanol e DTT.

Testes preliminares de extração de proteínas de folhas de eucalipto foram realizados avaliando-se três metodologias: extração com TCA seguida de fenol, extração somente com fenol e somente com TCA. De acordo com a Figura 8, a metodologia mais apropriada para a extração das proteínas de folha de eucalipto foi à extração combinada de TCA seguida de fenol. Esse tipo de extração para folhas de vegetal de modo geral garante um extrato de proteína mais limpo.

Estabelecida a metodologia de extração de proteínas, o próximo passo foi comparar os tratamentos, considerando-se os tempos de coleta do material submetido à tempos de exposição com o fungo. A Figura 8 ilustra todos os tratamentos realizados e mostra que no gel de primeira dimensão não há diferenças marcantes quando se comparam os tempos de coleta de 24 horas até 12 dias após inoculação. Com base nessa observação, optou-se por trabalhar com o material coletado após 24 horas da inoculação. Para entender o processo inicial de resposta da interação entre o fungo e a planta é fundamental conhecer-se em que período o vegetal mobiliza grande parte de sua energia para tentar anular a ação do fungo. Com 24 horas após a inoculação do fungo, Xavier et al. (2001) demonstraram que em clones resistentes de *E. grandis* o processo de morte celular programada é desencadeado.

Figura 8 – Da esquerda para direita. Gel desnaturante comparando os métodos de extração: M) marcador (kDa); T+F) TCA seguido de extração fenólica; F) extração fenólica e T) extração somente com TCA. Gel desnaturante de uma dimensão, comparando o perfil protéico dos tempos pré-estabelecidos de coleta dos clones resistentes e suscetíveis, M) marcador (kDa)

4.4 Focalização isoeétrica das tiras IPG

A separação das proteínas de folha pela focalização isoeétrica realizada em tiras de gradiente imóvel de poliacrilamida (BioRad) com pH de 3-10, Figura 9 B, revelou em testes preliminares, que o pH muito amplo diminui a eficiência de separação dos *spots* além de prejudicar o seqüenciamento, uma vez que mais de uma proteína é encontrada por *spot*. Um total de 750 µg de proteína foram aplicados nas tiras de poliacrilamida que foram submetidas a uma voltagem acumulada de 75.000 V.h. Valores abaixo de 70.000 V.h comprometeram a resolução dos *spots* no gel, Figura 9 A. O valor exato da voltagem acumulada a ser utilizada é muito variável de tecido para tecido. Dessa forma testes preliminares são necessários para que haja uma adequação de cada situação. No caso de tecido foliar de eucalipto, observou-se uma predominância das isoformas da subunidade maior da Ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco). Assim, optou-se por carregar a fita com uma quantidade de proteína 50-60% a mais do que a recomendada pelo fabricante. Quantidades maiores de proteínas na tira favorecem o aparecimento de proteínas presentes em baixa concentração na folha não comprometendo a resolução das proteínas em maior abundância.

Figura 9 – A) Focalização isoeétrica das proteínas de folhas de eucalipto submetidas a uma voltagem acumulada abaixo de 70.000 V.h. em faixa de pI 3-10. B) Focalização isoeétrica das proteínas de folhas de eucalipto submetidas a uma voltagem acumulada igual a 75.000 V.h, em faixa de pI 3-10. Na mesma figura observa-se um predomínio das proteínas correspondentes ao pI 4-7

4.5 Eletroforese bi-dimensional (2D-PAGE)

Ainda que as metodologias de focalização isoeletrica e separação por peso molecular das proteínas possam ser utilizadas separadamente, é comum combiná-las na eletroforese de duas dimensões (*Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). A combinação dessas técnicas resulta na separação do complexo de mistura de proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI) no eixo X e também de acordo com o peso molecular das proteínas no eixo Y (KINTER; SHERMAN, 2000).

Testes realizados em faixas mais amplas de pH como 3-10 (Figura 9 B) revelaram que há predominância da presença de *spots* na faixa de pH de 4-7, aproximadamente. Ao restringir a faixa de pH para 4-7 observou-se que para ambos os clones, resistente e suscetível, existe uma predominância de proteínas na faixa de pH equivalente a 4,5 a 6,8 com peso molecular entre 14 a 97 kDa.

Os géis foram preparados em triplicata e submetidos às mesmas condições de campo elétrico. Para cada tratamento, a eletroforese dos géis foi realizada ao mesmo tempo. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G 250*, corante característico por permitir uma boa repetibilidade dentro dos tratamentos. A vantagem do uso desse corante é justamente a sua facilidade de uso além da sua resposta linear à presença de proteína, quando presente em grandes quantidades. No caso de proteínas pouco abundantes, o corante coloidal (G 250) se liga de maneira eficiente permitindo a visualização do *spot*. Em geral, o corante coloidal pode detectar concentrações muito pequenas, da ordem de aproximadamente 0,5 pmol a 1 pmol em géis de uma única dimensão e em géis de duas dimensões a sensibilidade é ainda maior podendo detectar-se concentrações de proteínas da ordem de 0,2 pmol a 0,5 pmol (KINTER; SHERMAN, 2000).

Figura 10 – Géis bi-dimensionais com pI 4-7. CR24 – controle resistente 24 horas após inoculação dos uredósporos; IR24 - inoculado resistente 24 horas após inoculação dos uredósporos; CS24 - controle suscetível 24 horas após inoculação dos uredósporos IS24 – inoculado suscetível 24 horas após inoculação dos uredósporos, corados com G 250

4.6 Análise das imagens dos 2D-PAGE

As imagens foram obtidas com auxílio de um *scanner* (UTA-1100 *Labscan* v. 5.0, Amersham, Biosciences). Os parâmetros adotados para a obtenção das imagens foram constantes para todos os géis referentes às amostras dos clones resistentes e suscetíveis. Adotou-se uma resolução de 300 dpi para as imagens com filtro verde e transparente. As imagens capturadas foram utilizadas no programa *Image Master* v 3.01 (Amersham). Os valores dos parâmetros utilizados na análise dos géis foram: *Sensitivity* = 8982; *Operator Size* = 25; *Noise Factor* = 49 e *Background* = 1. Todos os géis foram analisados em triplicata. Assim, para os 12 géis observados, os parâmetros aplicados no ajuste da análise foram mantidos constantes.

As imagens dos géis analisados pelo programa gerou falsos *spots*, necessitando de uma intervenção de edição manual. Como o programa considera o total dos *spots* gerado igual a 100%, no momento da edição manual, os falsos *spots* foram removidos, reduzindo esse percentual. Para corrigir esse desvio, foi necessário adotar-se um fator de correção para cada volume obtido de cada tratamento. O fator de correção foi gerado dividindo-se o valor 100 pela soma do volume normalizado de cada repetição individualmente.

Os volumes dos *spots* foram normalizados de acordo com a ferramenta do programa. Os *spots* que não apresentaram repetibilidade foram desconsiderados. Cada *spot* normalizado representa a porcentagem que a proteína ocupa no gel. Ou seja, proteínas abundantes como a subunidade maior da Rubisco, representam de 40-50% das proteínas presente no gel. Esse valor em porcentagem é gerado a partir da interpolação entre a delimitação física gerada pelo *spot* associada à sua intensidade, gerada em *pixels*.

A comparação dos *spots* diferencialmente expressos entre controle e tratamento foi realizada com base em um gel de referência adotado. O gel de referência foi utilizado para o procedimento de alinhamento. Nessa ferramenta do programa, o gel de referência se sobrepõe aos géis controle e tratamentos alinhando os *spots*. O alinhamento foi gerado tanto automaticamente como manualmente em decorrência das deformidades intrínsecas de cada gel.

Um total de 466 *spots* foram identificados. No caso do clone resistente, quando promovemos a inoculação das folhas com uredósporos, um total de 73 *spots* aparecem exclusivamente no material inoculado e 115 *spots* apresentam expressão alterada refletida por alterações do volume das proteínas presentes no gel (Figura 11). No clone suscetível a inoculação

com uredósporos da ferrugem promoveu o aparecimento de 23 *spots* exclusivos além de 97 *spots* que apresentam expressão diferencial, ou seja, aumentando ou diminuindo o volume de determinadas proteínas (Figura 12).

Figura 11 – Comparação do clone resistente com exposição ao fungo e sem a exposição ao fungo, 24 horas de interação. (+) *spots* que apresentaram aumento no volume da proteína; (-) *spots* que apresentaram redução no volume da proteína; apenas os números referem-se a *spots* que apareceram devido a presença do patógeno. As marcas em vermelho referem-se à marcação e detecção automática dos *spots* pelo programa de análise de imagem. Faixa de pI 4-7

Figura 12 - Comparação do clone suscetível com exposição ao fungo e sem a exposição ao fungo, 24 horas de interação. (+) *spots* que apresentaram aumento no volume da proteína; (-) *spots* que apresentaram redução no volume da proteína; apenas os números referem-se a *spots* que apareceram devido a presença do patógeno. As marcas em vermelho referem-se à marcação e detecção automática dos *spots* pelo programa de análise de imagem. Faixa de pI 4-7

Em relação aos controles, resistentes e suscetíveis, as folhas que não entraram em contato com o fungo apresentaram *spots* exclusivos para cada clone, proteínas estas que são constitutivas de cada genótipo. A análise de imagem apresentada na Figura 13 A, revela que há uma predominância de *spots* de 14 a 45 kDa no clone resistente com 51 proteínas exclusivas. Em contraste, o clone suscetível, apresentou uma predominância de *spots* de 25 a 97 kDa e 47 proteínas exclusivas (Figura 13 B).

A

97 kDa
66 kDa
45 kDa
31 kDa
21 kDa
14 kDa

08, 26, 21, 20, 37, 388, 390, 391, 108, 416, 189, 145, 172, 202, 210, 396, 395, 397, 420, 239, 435, 193, 196, 417, 406, 405, 295, 309, 316, 252, 261, 264, 317, 339, 411, 355, 376, 372, 373, 352, 410, 421, 369, 371, 377

B

97 kDa
66 kDa
45 kDa
31 kDa
21 kDa
14 kDa

423, 428, 426, 425, 450, 32, 48, 55, 429, 83, 74, 444, 431, 445, 117, 116, 432, 69, 430, 160, 187, 433, 434, 215, 211, 400, 234, 243, 241, 238, 258, 440, 441, 342, 335

Figura 14 – *Spots* comuns dos clones resistentes e suscetíveis quando expostos ao uredósporo da ferrugem, pI 4-7

Um quarto tipo de análise empregada nos géis 2D-PAGE foi realizada comparando-se os géis do clone resistente inoculado com os géis do clone suscetível também inoculado. A Figura 14 mostra a imagem do gel do clone resistente, no qual houve alteração da expressão das proteínas indicadas pelo programa. Nesse tipo de análise, comparou-se o comportamento de cada genótipo quando o fungo está presente. Observou-se 127 *spots* que variaram o volume com nível de significância $p < 0,05$ pelo teste *t*. Os 35 *spots* presentes na Figura 14 são comuns para ambos os clones, resistente e suscetível. A comparação realizada nessa figura levou em consideração *spots* que no mínimo dobraram de volume ou então reduziram-se pela metade. O *spot* 22, por exemplo, em relação ao clone suscetível apresenta uma expressão de cerca de 6 vezes maior quando em contato com o fungo, por outro lado o *spot* 87, no mesmo raciocínio, possui sua expressão reduzida cerca de 4,5 vezes.

Utilizando a tecnologia SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), Moon et al. (2007), trabalharam com a comparação do perfil de expressão gênica de árvores resistentes e suscetíveis de *Eucalyptus grandis* expostas à *Puccinia psidii*. Analisaram 71.609 *tags*, sendo que 39.964 *tags* eram de plantas resistentes e 31.645 *tags* de plantas suscetíveis. Esse número total representa uma conta cumulativa onde estão representados 5.213 genes na biblioteca resistente e 4.095 genes na biblioteca suscetível. Os autores encontraram 232 *tags* diferencialmente expressas para os resistentes e 239 para os suscetíveis, perfazendo um total de 471 *tags* nessas condições.

Ainda no trabalho, foram encontrados genes preferencialmente expressos nas bibliotecas suscetíveis. A categoria Metabolismo mostrou aumento na expressão da Rubisco ativase que está relacionada com a ativação do complexo da Rubisco, porém no caso das plantas suscetíveis, a capacidade fotossintética é reduzida, ocasionando um aumento na expressão da ativase, provavelmente numa tentativa de manter os níveis de fixação de carbono, uma vez que o tecido foliar é degradado quando ocorre a fase de esporulação do fungo. Dentro da categoria de Processos Celulares, os autores descrevem genes que foram diferencialmente expressos, aumentando a sua expressão (ABA/WDS, NRP, TCTP, USP e calmodulina). Na categoria de Transporte, envolvendo o tráfico de membranas, foi descrito a expressão preferencial do fator de ribosilação do ADP, importante organizador celular durante a resposta de estresse biótico e abiótico.

Analisando os genes preferencialmente expressos nas bibliotecas resistentes, Moon et al. (2007) encontraram na categoria Metabolismo uma *tag* da galactinol sintase, enzima chave para síntese de rafinose. Esse oligossacarídeo está ligado a estresses relacionados à seca, salino e calor. Para a categoria de Processos Celulares, foram encontradas *tags* de proteínas ligadas à resposta hipersensível, causada por patógenos biotróficos, sugerindo que estes genes protegem a célula e mantém a presença de ERO durante a infecção e processo de defesa do hospedeiro. Representantes de α -tubulina e β -tubulina, foram encontrados na categoria de Estrutura e Organização, estas proteínas estão muitas vezes envolvidas no processo de polarização celular, processo esse que desloca o núcleo até o sítio de infecção, ocorrendo deposição de substâncias que impedem a penetração do patógeno.

Os autores discutem que a categoria mais expressa nos resistentes é a de Metabolismo é os genes superexpressos nessa categoria foram UDP-glicose pirofosforilase, UDP-glicose

desidrogenase e sacarose sintase, os quais são envolvidos na produção de precursores de polímeros da parede celular.

De acordo com Moon et al. (2007), pelo número e tipos de genes superexpressos nas plantas resistentes, dois tipos de respostas contribuem para o processo de resistência. Primeiro, a polarização celular, que envolve o rearranjo maciço do citoesqueleto, translocação do citoplasma e núcleo no sítio de penetração do fungo, local este que sofre reforço de sucessivas camadas de material de parede celular. Segundo, um grupo específico de mecanismos anti-patógeno, incluindo resistência sistêmica adquirida, resposta hipersensível e resposta oxidativa.

Figura 15 – Visão geral das comparações dos géis 2D-PAGE realizadas entre o clone resistente e clone suscetível

De forma resumida, a Figura 15 apresenta uma visão geral das interações realizadas durante o experimento. Na mesma figura é possível observar a quantidade de spots que variam o volume nas quatro situações analisadas, presentes nas áreas de intersecções dos círculos. Nota-se também que o surgimento de novas proteínas no clone resistente, representado pelo círculo azul, é muito maior do que as proteínas que surgem no clone suscetível. Esse fato possivelmente ocorre em razão da ativação de muitos fatores de transcrição desencadeados pelo contato entre o

fungo e o hospedeiro, além da presença de proteínas de defesa vegetal que são produzidas no momento da infecção e que atuam na tentativa de barrar o avanço do fungo. Por outro lado, o desaparecimento de proteínas no clone resistente, representado pelo círculo cinza, é menor quando comparado com as proteínas do clone suscetível, fato este que provavelmente ocorre pela degradação de proteínas relacionadas ao fotossistema além das proteínas ligadas à parede celular.

4.7 Carboidratos vs. Patossistema *E. garndis* – *P. psidii*

A cutícula e a parede celular dos vegetais são barreiras físicas pré-formadas que constituem a primeira linha de defesa da planta contra a penetração do patógeno. São também fontes dos sinais utilizados no processo de invasão para ativar respostas patogênicas ou para as plantas induzirem mecanismos de defesa. Todavia, novos dados moleculares nos dão uma visão diferente da parede celular da planta, tradicionalmente considerada uma barreira estrutural passiva à invasão do patógeno. Aparentemente as plantas são capazes de perceber a perturbação na parede celular através do monitoramento integral da sua estrutura. Fungos biotróficos podem manipular esse sistema de vigilância para o estabelecimento do biotrofismo, que destrói a rota sinalizadora interconectada de defesa da planta (JONES; TAKEMOTO, 2004; SCHULZE-LEFERT, 2004).

Além de proteínas que desempenham um importante papel de regulação do mecanismo de defesa diante dos patógenos, a parede celular dos vegetais é constituída basicamente por polissacarídeos, como celulose, hemiceluloses e pectinas, (JUDE, 2006). Suas funções nos vegetais são as mais diversas possíveis. Proporcionam às células rigidez mecânica, mantêm sua morfologia, controlam a expansão celular e transporte intercelular, protegem a célula e também participam na comunicação intercelular. Como muitas destas funções são exigidas simultaneamente em vários estádios de desenvolvimento do vegetal, a parede vegetal possui grande flexibilidade com o máximo de resistência, devido ao elevado controle metabólico, com regiões de extrema complexidade, com altos conteúdos de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos. Dessa forma, a determinação exata da composição dessas substâncias na parede, fornece informações importantes para o esclarecimento das funções específicas que determinado tipo de célula possui. (NORTHCOTE, 1972; BRETT; WALDRON, 1990; CARPITA; GIBEAUT, 1993; GIBEAUT; CARPITA, 1994; DHUGGA, 2001; RAVEN et al., 2001).

As quantidades dos carboidratos da parede celular das folhas observadas nos clones de eucalipto durante o experimento apresentaram diferenças mais acentuadas no período que corresponde às primeiras 24 horas após a inoculação do uredósporos. As primeiras 24 horas são suficientes para que o haustório se desenvolva no interior da célula, a planta responde alterando as quantidades dos carboidratos presentes na parede dos clones, em uma tentativa de barrar fisicamente a entrada da hifa infecciosa. As hexoses representam a somatória dos carboidratos: glicose, galactose, manose e rhamnose. Na Tabela 2, referente ao clone resistente, houve aumento do nível de hexose gradativamente de 24 horas até 12 dias após a inoculação. Este aumento gradativo representa o aumento principalmente dos teores de glicose e galactose, depositados na forma de calose, funcionando como barreira para evitar a entrada do fungo. No caso do clone suscetível, representado pela Tabela 3, a queda do nível de hexose, nas primeiras 24 horas indica que houve consumo dos carboidratos por parte do fungo, indício que o fungo libera enzimas que degradam os componentes das hemiceluloses no momento do contato com a célula vegetal. Em ambas as Tabelas (2 e 3) houve aumento de pentoses, que corresponde à somatória dos carboidratos arabinose e xilose, ou seja, tanto o clone resistente quanto o suscetível, responderam aumentando os níveis de pentose presentes na parede das células em relação às plantas controles não expostas aos uredósporos de *P. psidii*.

Tabela 2 – Composição química da parede celular da folha dos clones resistentes de eucalipto relativo ao controle não inoculado (CR24). Os valores são médias expressas em mg/g de matéria seca

	CR24	IR24	IR6D	IR12D
Arabinose	31,632	35,073 **	31,265	30,498
Rhamnose	7,548	9,425	7,187	7,845
Manose	1,591	1,875	1,796	1,687
Hemicelulose	105,318	145,945 **	159,985 **	158,803
Pentoses	41,280	46,992 **	41,496	39,805
Hexoses	64,037	98,953 **	118,489 **	118,998 **
Ac. Glucurônico	1,553	1,464	1,360	1,290 **
Urônicos totais	46,289	48,662	45,116	41,224 **

** Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 % pelo teste de Dunnett

Tabela 3 - Composição química da parede celular da folha dos clones suscetíveis de eucalipto relativo ao controle não inoculado (CS24). Os valores são médias expressas em mg/g de matéria seca

	CS24	IS24	IS6D	IS12D
Arabinose	32,074	36,956 **	32,497	31,575
Rhamnose	7,435	9,251	7,923	7,600
Manose	1,433	1,471	1,551	2,167 **
Hemicelulose	179,543	148,804 **	179,779	172,756
Pentoses	41,612	50,788 **	41,727	40,119
Hexoses	137,931	98,015 **	138,052	132,637
Ac. Glucurônico	1,114	1,362 **	1,163	1,217
Urônicos totais	39,904	45,496 **	40,094	38,318

** Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 % pelo teste de Dunnett

O nível de glicose variou de forma significativa para os clones resistentes e suscetíveis, de acordo com a Figura 16. A glicose analisada possivelmente seja proveniente das hemiceluloses e pectinas. O tratamento com TFA ataca apenas os carboidratos originados das hemiceluloses, ou seja, carboidratos que estão fracamente ligados a parede celular. O resíduo gerado nesse tipo de tratamento foi detectado como exclusivamente concentração de celulose. No caso do clone resistente, o nível de glicose aumentou significativamente nas primeiras 24 horas após à inoculação. Sua quantidade de 25,143 mg/g saltou para 51,451 mg/g de tecido foliar, ou seja, dobrou durante esse período. Esse comportamento provavelmente está intimamente relacionado à deposição de papila formada de calose (polímero de β -1,3-D-glucana) no interior da parede no sítio da penetração do patógeno com objetivo de barrar a entrada do fungo (FERREIRA; MONTEIRO, 2006). As papilas são fortificações localizadas no interior da parede celular no sítio de penetração mediante o ataque do patógeno e são geralmente consideradas como barreira estrutural induzida. Contudo, observações recentes revelaram que processos moleculares ocorrem tanto na superfície quanto dentro da parede celular, podendo funcionar como agente anti-patogênico (FERREIRA; MONTEIRO, 2006).

No período de 24 horas até aproximadamente 6 a 7 dias após a inoculação, os níveis de glicose aumentam consideravelmente. Esse comportamento pode representar o período crítico do estabelecimento da doença, ou seja, até o 6º/7º dia, a célula vegetal tenta barrar a entrada do fungo no local da penetração, o que não ocorre no clone suscetível ou pode ocorrer tardiamente.

O período de aumento dos níveis de glicose do clone resistente ilustrado na Figura 16 representa o mesmo período em que os primeiros sintomas visuais aparecem no clone suscetível. Isso possivelmente pode indicar que a glicose seja proveniente da calose que está sendo depositada, por exemplo, para barrar fisicamente a penetração da hifa infectiva.

O comportamento do clone suscetível em relação às quantidades de glicose foi diferente do clone resistente. No período inicial da inoculação a quantidade de glicose foi reduzida praticamente à metade. A glicose apresentou uma variação de 103,478 mg/g para 55,487 mg/g no tecido foliar. Comportamento esse, característico de fungos biotróficos que utilizam a parede celular do hospedeiro como fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Esse comportamento foi relatado por Xavier (2001) que observou também que em eucalipto o desenvolvimento do fungo no interior do clone suscetível ocorreu após 3 dias de inoculação. Durante esse período incubatório, o fungo obtém energia consumindo os carboidratos da parede, principalmente a glicose, através da hidrólise, lançando mão de enzimas, como por exemplo as pectinases, xilanases e galacturonases.

O aumento nos níveis de glicose proveniente das hemiceluloses observado no nosso trabalho no período de 24 horas até 6 dias após a inoculação deve ser relativo principalmente à percepção do fungo pela célula vegetal, provavelmente na transição do 2º/3º dia de inoculação. A glicose proveniente das hemiceluloses aumenta durante a evolução do processo da doença até retomar seu nível inicial antes da inoculação, provavelmente uma característica metabólica particular do genótipo suscetível. Um dado interessante observado nos clones diz respeito às quantidades iniciais de glicose encontradas nos clones. Antes da inoculação, o clone resistente apresenta uma quantidade cerca de 3 vezes mais baixa de glicose proveniente da hemicelulose, quando comparado ao clone suscetível. Porém durante o período avaliado até 12 dias após a inoculação, o clone resistente sempre aumentou a quantidade de glicose. Já o clone suscetível apresentou uma queda retomando posteriormente o seu nível inicial. Esse comportamento provavelmente demonstra a importância desse genótipo em manter a glicose nos níveis iniciais, uma vez que a folha se mantém em expansão. Como a ferrugem é um fungo que degrada o limbo foliar, a planta possivelmente compensa a sua deficiência fotossintética aumentando a superfície foliar pelo menos até o momento inicial da doença.

Figura 16 - Comparação entre níveis de glicose dos clones resistentes e suscetíveis com 24 horas, 6 dias e 12 dias após inoculação com uredósporos em relação ao controle não inoculado

** Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 % pelo teste de Dunnett

O conteúdo de celulose presente na parede celular apresentou aumento nas primeiras 24 horas após a inoculação. O comportamento da curva foi parecido para os dois clones, inclusive os níveis iniciais e finais após 24 horas, funcionando como barreira física para a entrada do fungo. Na curva correspondente ao clone resistente o aumento da celulose possivelmente represente um reforço na tentativa de barrar o fungo e a queda que ocorre após as 24 horas possivelmente é devido ao crescimento foliar, levando a celulose aos níveis iniciais característico do genótipo. Já na curva correspondente ao clone suscetível, possivelmente a degradação da parede celular pelo fungo no momento da esporulação reduz drasticamente os níveis de celulose nesse genótipo.

Nos trabalhos que utilizaram a microscopia eletrônica convencional no momento da interação entre a célula do hospedeiro e a hifa do fungo, revelaram que a parede celular da célula do hospedeiro raramente sofrem alterações no sítio de penetração. A dissolução da parede celular do hospedeiro pela fungo é restrita ao sítio de contato (CHONG et al., 1981; TAYLOR; MIMS, 1991), isto indica que a penetração na parede celular do hospedeiro ocorre de forma ativa e localizada apenas no sítio de contato.

Hu e Rijkenberg (1998) trabalhando com a interação entre trigo e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, utilizando sondas marcadas para celulose, mostraram que a maioria dos sítios de penetração não sofreram distorções na parede celular, resultando numa liberação de celulases ao redor do sítio de infecção. Contudo, menos de 24 horas, a sonda marcada para celulose revelou

que a parede celular do hospedeiro é empurrada para o interior do citoplasma, sem que haja rompimento da membrana. Dessa maneira, a penetração por *P. recondita* principalmente ocorre por ação de enzimas celulolíticas e ação de forças mecânicas, facilitando a penetração. As atividades das enzimas celulolíticas foram investigadas na ferrugem do feijoeiro (*Uromyces viciae-fabae*) e revelaram que as celulases são formadas pelo fungo depois da percepção de estímulos tigmotrópicos e continuam a ser produzidas nos estágios mais tardios da doença, como a de produção das estruturas de diferenciação (DEISING; MENDGEN, 1992; HEILER et al., 1993)

O aumento nos teores de galactose e xilose podem ser compreendidos devido ao aumento dos níveis de hemiceluloses principalmente no clone resistente (Figura 17). Na parede celular das plantas, as hemiceluloses mais abundantes são as xiloglucanas, galactoglucanas ou ainda galactoxiloglucanas, onde estão associadas às microfibrilas de celulose, promovendo a sua união dando resistência à parede celular. Isso possivelmente explique porque os teores de galactose e xilose são mais elevados no clone resistente.

O ácido galacturônico está relacionado à formação de pectinas e estas funcionam também como barreira física para o processo de penetração da hifa. De acordo com a Figura 17, o clone resistente apresenta níveis mais elevados de ácido galacturônico em relação ao clone suscetível, em todos os pontos da coleta. Todo o processo de instalação do material péctico ocorre no prazo de 24 horas após à inoculação, período vital para barrar o processo de instalação do haustório do fungo. Proporcionalmente o clone suscetível aumenta os níveis do ácido galacturônico mais que o clone resistente, porém o clone resistente possivelmente é mais efetivo no tipo de ligação e conseqüentemente na barreira formada. As pectinas, representam de 20-30% dos componentes da parede celular de muitos vegetais e podem ser clivadas por endopoligalacturonase (EPGs), secretadas pelo fungo, que resulta na formação de um elicitor ativo transitório denominado oligogalacturonídeos (OGAs) que gera fragmentos de 9 a 15 monômeros (FERREIRA; MONTEIRO, 2006). O tratamento de folhas de plantas de uva com OGAs aumentou a proteção contra *Botrytis cinerea* e induziu a resposta de defesa nessas plantas (AZIZ et al., 2004). A geração rápida e transitória de H_2O_2 , resultou na expressão diferencial de 9 genes de defesa e estimulou a atividade de quitinases e β -1,3-glucanases, como resposta à presença do fungo. Assim, os oligossacarídeos gerados pela ação das glucanases não só provêm o fungo com fonte de carbono, mas também são percebidos pelo mecanismo de defesa vegetal. Para escapar do

processo de defesa, os OGAs são rapidamente convertidos em fragmentos pequenos e biologicamente inativos pelas EPGs (AZIZ et al., 2004).

Figura 17 - Comparação entre níveis de celulose, galactose, xilose e ácido galacturônico, dos clones resistentes e suscetíveis com 24 horas, 6 dias e 12 dias após inoculação com uredósporos em relação ao controle não inoculado

** Diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5 % pelo teste de Dunnett

Muitos fungos patogênicos liberam enzimas hidrolíticas como proteases e glicanases (p. ex. galacturonases, xilanases) com objetivo de desestruturar localizadamente o arranjo da parede celular em fragmentos de polímeros de parede, facilitando assim, a colonização da célula hospedeira (THEIS e STAHL, 2004).

Para aumentar o tempo de vida biologicamente ativo dos oligossacarídeos, as plantas liberam inibidores das glicanases fúngicas. Por exemplo os poligalacturonases vegetais (PGIPs) são glicoproteínas presentes no apoplasto de muitas plantas que formam complexos reversíveis de alta afinidade com os EPGs dos fungos, que reduzem sua atividade catalítica em 1 a 2 ordens de magnitude. Por limitar a atividade da EPG, o tempo de vida e a concentração dos OGAs são aumentados, prolongando ou aumentando as respostas de defesa vegetal, além de efetivamente detectar o invasor (POWELL et al., 1995; DESIDERIO et al., 1997). As PGIPs limitam o crescimento dos patógenos das plantas e promovem resposta de defesa vegetal. Eles pertencem à superfamília de proteínas LRR, as quais também incluem os produtos de muitos genes de resistência vegetal (DI et al., 2006).

Uma vez no interior do tecido do hospedeiro, muitos fungos biotróficos, como por exemplo, a *P. psidii* entre outros, formam o haustório no local onde seu suposto papel na captação de nutrientes, como hexoses e aminoácidos, via transporte simporte de prótons dirigidos (SCHULZE-LEFERT e PANSTRUGA, 2003; SCHULZE-LEFERT, 2004). Curiosamente, o aumento na atividade da quitina deacetilase é observada depois do desenvolvimento do apressório. A deacetilação da quitina na superfície da hifa de penetração foi sugerida como um mecanismo de proteção da parede celular do fungo contra à ação de quitinases vegetais (MENDGEN et al., 1996).

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

- A comparação dos géis dos clones, resistentes e suscetíveis, não expostos à ferrugem revelaram proteínas exclusivas de cada genótipo;
- A comparação entre os clones resistentes e suscetíveis expostos à ferrugem apresentaram 127 *spots* comuns entre eles. Para as mesmas proteínas, foram encontradas alterações drásticas na sua expressão, o que reflete no comportamento dos genótipos quando submetidos a estas condições;
- Os carboidratos da parede celular provenientes das hemiceluloses e pectinas alteraram seus níveis quando houve inoculação do fungo. O período que houve maior alteração ocorreu com 24 horas após a inoculação do uredósporos fungo sob os clones;
- A glicose foi o carboidrato proveniente das hemiceluloses que apresentou maior discrepância entre os clones analisados. Esse açúcar da parede parece ter uma função muito importante no processo de resistência à ferrugem, fazendo parte de uma estrutura denominada calose, que reforça a parede impedindo a entrada do fungo. Para o clone suscetível, o consumo dos carboidratos provenientes das hemiceluloses, principalmente a glicose, indica que há liberação de enzimas induzida pelo contato com a célula vegetal.

Em decorrência de defeito técnico não foi possível seqüenciar as proteínas detectadas nas análises de imagem dos géis 2D-PAGE. O espectrômetro de massas apresentou um defeito eletrônico que impedia a comunicação entre os componentes do equipamento, impossibilitando a operação MS/MS do espectrômetro. O defeito ocorreu no mês de Setembro 2007 e foi solucionado no mês de Dezembro 2007, porém não voltou a seu pleno funcionamento necessitando de alguns ajustes a serem realizados no primeiro semestre de 2008.

O trabalho terá continuidade no momento que o espectrômetro de massas voltar ao seu funcionamento norma, então os *spots* serão recortados e terão as proteínas eluídas e digeridas com enzima tripsina de acordo com Parker et al. (1998), com protocolo modificado. Os fragmentos dos géis recortados terão o corante removido. Após os *spots* estarem completamente

desidratado, serão reduzidos e alquilados com uma solução de DTT a 60°C por 40 minutos e iodoacetamida no escuro por 30 minutos, respectivamente.

Na digestão, os fragmentos dos *spots* serão reidratados com solução contendo 150 ng de tripsina em 25 mM de bicarbonato de amônio e mantidas a 37°C por 12 horas. Os peptídeos serão eluídos da acrilamida com lavagens em solução de. Os peptídeos serão ressuspensos em 1% (v/v) ácido fórmico e então seqüenciados por espectrometria de massas.

As proteínas a serão seqüenciadas em espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (ESI-MS/MS *quadrupole/acceleration orthogonal time-of-flight*) da Water-Micromass acoplado a um sistema *on-line* de HPLC capilar, CapLC (Waters®). A separação dos peptídeos será realizada usando-se uma pré-coluna C18 (Sentry™ Guard Column C18 Waters®) seguida por uma coluna de fase reversa C18 (Symmetry® C18 5 µm 0,32 x 150 mm Waters®). Os peptídeos serão eluídos através da variação do gradiente do tampão A [95% (v/v) água, 5% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) ácido fórmico] e do tampão B [95% (v/v) acetonitrila, 5% (v/v) água e 0,1% (v/v) ácido fórmico]. Os espectros de massas a serão analisados e processados com o auxílio dos programas MassLynx NT BioLynx V 4.0 e ProteinLynx V 2.1 da Micromass.

REFERÊNCIAS

ACUÑA, M. GARRAN, S.M. Detección de *Kirramyces epicoccoides*, *Puccinia psidii* y *Ciniothyrium zuluense* agent causales de enfermedades en Eucalyptus spp en la zona de Concoredia, entre rios, **Ria**. Argentina, n. 33, p. 135-148, 2004.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 4 ed. New York, Academic Press, p. 635, 1997.

ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins : fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

ALFENAS A.C.; ZAUZA E.A.V.; MAFIA R.G. ASSIS T.F. **Clonagem e doença do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004, p. 442.

ALLAN, A.C.; FLUHR, R. Two distict sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1-20, 1998.

ALVAREZ, M.E.; PENNELI, R.I.; MEIJER, P.J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 92, p. 1-20, 1998.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E 1758-01**. Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography. USA. 2001.

ANDERSON, L; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundance in human liver. **Electrophoresis**, Weinheim, n. 3-4, v. 18, p. 533-537, 1997

ANDRADE, A. **Avaliação de parâmetros que influenciam a transformação genética do *Eucayptus grandis* via *Agrobacterium***. 2001, 82p. Dissertação (Mestrado-Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE MADEIRA PROCESSADA MECANICAMENTE. Disponível em: http://www.ambici.com.br/dados_setoriais.html
Acessado em 14 janeiro de 2008

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTA PLANTADA. Disponível em: www.abraflor.org.br/estatistica.asp.
Acessado em 14 janeiro de 2008

AZIZ, A.; HEYRAUD, A.; LAMBERT, B. Oligogalacturonides signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*, **Planta**, Berlin, n. 218, p. 767-774, 2004.

BACHA, C.J.C.; BARROS, A.L.M. Reforestation in Brasil: recente evolution and the future. **Sciencia Florestalis**, Piracicaba, n. 66, p. 191-203, 2004.

BAKER R.E.D.; DALE, W.T. Fungi of Trinedad and Tobago. **Mycological Papers**, Cambridge, n. 33, p. 1-123, 1951.

BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. **Active oxygen and pathogenesis in plants**. In: Stacey, G. e Keen, N.T. (Eds). *Plant Microbe Interactions*, St. Paul, Minnesota. APD Press, p 81-119, 1999.

BOOLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annuals Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Kidlington, v. 46, p. 189-214, 1995.

BOOTH, T.H.; OLD, K.M.; JOVANOVIĆ, T. A preliminary assessment of high risk areas for *Puccinia psidii* (*Eucalyptus* rust) in the Neotropics and Australia. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Australia, v. 82, p. 295–301, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdh* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. Dissertação (Mestrado na área de Fisiologia e Bioquímica de Plantas), Escola Superior de Agricultura Luiz e Queiroz, Piracicaba, 73p. 2007.

BRETT, C.; WALDRON, K.W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. Hyman, London: Unwin, p. 75-111, 1990.

BREUSEGEN, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F; INZÉ, D. The role of active axxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, n. 161, v. 3, p. 405-414, 2001.

CAMPO, S.; CARRASCAL, M.; ABIÁN, J.; SAN SEGUNDO, B. The defense response of germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. **Proteomics**, Weinheim, n. 4, p. 383-396, 2004.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25. p.1327-1333, 2004.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p.1-30, 1993.

CARR, S.G.M.; CARR, D.J.; ROSS, F.L. Male flowers in *Eucalyptus*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 19, n. 1, p. 73-83, 1971.

CHARDÓN, C.E.; TORO, R.A. Mycological exploration of Venezuela. **Monographs of the University of Porto Rico Series B**, n.2, p. 1-351, 1930.

CHARDÓN, C.E.; TORO, R.A. Mycological exploration of Venezuela. **Monographs of University of Porto Rico Series B**, n. 2, p. 1-351, 1934.

CHONG, J.; HARDER, D. E.; ROHRINGER, R. Ontogeny of mono-and dikaryptic rust haustoria: Cytochemistry and ultrastructural studies. **Phytopathology**, St. Paul, n. 71, p. 975-983, 1981.

COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J.; ALFENAS, A.C.; CROUS, P.W. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant Disease**, St. Paul, n. 82, p. 819-825, 1998.

CMI. *Puccinia psidii* Winter 4th ed. Commonwealth Mycological Institute Distribution Maps of Plant Disease, n.181, p.1-2, 1987.

CRESSWELL, R.D.; BOURLAY, M.; FLANCLET, A. Vegetative propagation of Eucalyptus. **Tissue Culture in Forestry**, Dordrecht: Martinus Nuyhoff, 1985, p. 45-72.

DAMERVAL, C.; VIENNE, D.; ZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling protein. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 7, p. 53-54, 1986.

DAVIS, G.L. Floral morphology and the development of gametophytes in *Eucalyptus stellulata* Sieb. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 17, n. 2, p. 177-190, 1969.

DE GOES, A.; MARTINS, R.D.; DOS REIS, R.F. Effect of copper fungicides, sprayed alone or in combination with mancozeb, in expression of phytotoxicity symptoms and rust control caused by *Puccinia psidii* in guava. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, n. 26, p. 237-240, 2004.

DEISING, H.K; MENDGEN, K. **Development control of enzyme production and cell wall modification in rust fungi, and defense reactions of the host plant**. In: Sthal, U.T. (Eds), *Molecular Biology of Filamentous Fungi*, pp 27-44. Weinheim, New York, 1992.

Department of Environment and Heritage (2004a) Australian flora and vegetation statistics. Available at <http://www.anbg.gov.au/anbg/australian-flora-statistics.html> acesso em 16 novembro 2006.

DESIDERIO, A.; ARACRI, B.; LECKIE, F.; MATTEI, B.; SALVI, G.; TIGELAAR, H.; VAN ROEKEL, J.S.; BAULCOMBE, D.C.; MELCHERS, L.S.; DE LORENZO, G.; CERVONE, F. Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, n. 10, p. 852-860, 1997.

DHUGGA, K.S. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 488-493, 2001.

- DI, C.; ZHANG, M.; XU, S.; CHENG, T.; AN, L. Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, n. 32, p. 91-100, 2006.
- DI FONZO, M.A. Las Uredinales del Chaco. Publicação Miscelâneo Ministerio Agricultura Buenos Aires Series A, n. 12, p. 1-12, 1946.
- DI STÉFANO, J.F.; FOURNIER, L.A.; CARRANZA, J.; MARIN, W.; MORA, A. Potencial invasor de *Syzygium jambos* (Myrtaceae) en fragmentos boscosos: el caso de Ciudad Coln, Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, San José, n.45, p. 567-573, 1998.
- DIANESE, J.C.; MORAES, T.S.A.; SILVA, A.R. Response of *Eucalyptus* to field infection by *Puccinia psidii*. **Plant Disease**, St. Paul, n. 68, p. 314-316, 1984.
- DUBOIS, M., GILLES, D.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F., Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**. Washington v. 28, p. 350-356. 1956.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, Washington, v. 246, p. 64-71, 1989.
- FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto-ocorrência, temperatura para germinação de uredosporos, produção de teliosporos, hospedeiros alternativos e resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n.6, p. 603-604, 1981.
- FERREIRA, F.A.; SILVA, A.R. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *E. saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 7, v. 1, p. 23-27, 1982.
- FERREIRA, F.A. Ferrugem do eucalipto. In: Patologia Florestal-Principais doenças florestais no Brasil. **Sociedade de Investigações Florestais**, Universidade de Viçosa, Viçosa, p. 129-152, 1989.
- FERREIRA, R.B.; MONTEIRO, S. Fungal pathogens: the battle for plant infection. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, n. 25, p. 505-524, 2004.
- FIGUEIREDO, M.B. Clico vital e ecologia de *Puccinia psidii*. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1, p. 69-71, 2001.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for gene concept. **Annual Reviews of Phyto pathology**, Palo Alto, n. 9, p. 275-296, 1971.
- FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da extração vegetal e da silvicultura, www.ibge.gov.br/ acessado em 15 junho de 2005.

GARAVELLI, J.S.; HOU, Z.; PATTABIRAMAN, N.; STEPHENS, R.M. The RESID data of protein structure modifications and the NRL-3D sequence-structure database. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 29, p. 199-201, 2001.

GARRE, V.; TENBERGE, K.B.; EISING, R. Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps purpurea* during infection of rye: putative role in pathogenicity and suppression of host defence. **Phytopathology**, Minnesota, n. 88, p. 744-753, 1998.

GIBEAUT, D.M.; CARPITA, N.C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 8, p. 904-915, 1994.

GLEN, M.; ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.; WINGFIELD, M.J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy – a review. **Australian Plant Pathology**, Clayton, v. 36, p. 1-16, 2007.

GONÇALVES, S.S. Lista preliminary das doenças das plantas do Estado do Espírito Santo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, p. 1-12, 1929.

GOODMAN, R.N.; NOVACKY, A.J. **The hypersensitive reaction in plant to pathogens – a resistance phenomenon**. St. Paul, Minnesota, APS Press, 1994, vol 1.

GRATTAPAGLIA, D.; BRADSHAW, J.R. Nuclear DNA content of commercially important *Eucalyptus* species and hybrids. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 24, n. 5, p. 1074-1078, may 1994.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, n. 19, p. 1720-1730, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance gene. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, n. 48, p. 575-607, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. **Responses to plant pathogens**. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. e Jones, R.L. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Rockville, ASP Press, pp. 1102-1156, 2000.

HARTMAN, G.L.; WANG, T.C.; SHANMUGASUNDARAM, S. **Soybean rust research: progress and future prospects**. In: Napompeth, B. (Ed) *World Soybean Research Conference*. Chang Mai, Thailand. Proceedings. 1994. 581p. pp.180-186.

HE, Z.H.; HE, D.; KOHORN, B.D. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 55-63, 1998.

HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Shannon, v. 160, p. 1085-1093, 2001.

HEILER, S.; MENDGEN, K.; DESING, H. Cellulolytic enzymes of the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae* are regulated differentiations-specifically. **Mycological Research**, New York, n. 97, p. 45-52, 1993.

HENNEN, J.F.; FIGUEIREDO, M.B.; DE CARVALHO, A.A. JR.; HENNEN, P.G. Catalogue of the species of plant rust fungi (Uredinales) of Brazil. **Instituto de Pesquisas, Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2005, vol 1.

HO, C.K.; CHANG, S.H.; TSAY, J.Y.; TSAI, C.J.; CHIANG, V.L.; CHEN, Z.Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants, **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 17, n. 9, p. 675-680, 1998.

HOVING S.; GERRITS B.; VOSHOL H, MULLER D.; ROBERTS R.C.; VAN OOSTRUM J. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, p. 127-134, 2002.

HU, G.G.; RIJKENBERG, H.J. Cytochemistry of the interaction between Wheat (*Triticum aestivum*) and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*: Localization of Cellulose, Chitin, Glucose/Manose, Galactose and Fucose. **Journal of Phytopathology**, Berlin, n. 146, p. 365-377, 1998.

HÜCKELHOVEN, R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistence and susceptibility. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, n. 45, p. 101-127, 2007.

HUNT P. Cuticular penetration by germinating uredospores. **Transactions of the British Mycological Society**, London, n. 51, 103-112, 1968.

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

JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, Campinas, n. 4, v. 8, p. 475-487, 1944.

JONES, D.A.; TAKEMOTO, D. Plant innate immunity-direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules, **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, n. 16, p. 48-62, 2004.

JUDE, N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes, **Trends in Plant Science**, Kidlington, n. 11, p. 359-367, 2006.

JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 28, p.184-188, 2003.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10.000 daltons. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 60, n. 20, p.2299-2301, 1988.

KERN, F.D.; CIFERRI, R.; THURSTON JR, H.W. The rust-flora of the Dominican Republic. **Annales of Mycologici**, Horn, n. 31, p. 1-40, 1933.

KILLGORE, M.; HEU, R.A. A rust disease on ohia. State of Hawaii, Departament of Agriculture, New Pest Alert, n. 5-4. Available at <http://www.hawaiiag.org/hdoa/npa05-04-ohiarust.pdf> acessado em 20 dezembro de 2005.

KINTER, M.; SHERMAN, N.E. **Protein sequencing and identification using tandem amss spectrometry**. Wiley-Interscience, New York, 2000, 301p.

KOCH DE BROTOS, L.; BOASSO, C. Lista de enfermedades de los vegetales em el Uruguay. Reporte Uruguay Ministerio Ganadado y Agricultura Laboratorio **Fisiologia y Patologia Vegetal**, Uruguay n. 106, p. 1-65, 1955.

KOHORN, B.D.; KOBAYASHI, M.; JOHANSEN, S.; RIESE, J.; HUANG, L.F.; KOCH, K.; FU, S.; DOTSON, A.; BYERS, N. An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 307-316, 2006.

KOHORN, B.D. WAK, S. Cell wall associated kinases. **Current Opinion in Cell Biology**, Philadelphia, v. 13, n. 5, p. 529-533, 2001.

KRANZ, J. **Measuring Plant Disease**. In: KRANZ, J. e ROTEM, J. E. Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Heidelberg, Springer-Verlag, 1988, p.35-50.

KRISHNA, R.G.; WOLD, F. Post-translational modification of proteins. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, New York, v. 67, p. 265-98, 1993.

KRUGNER, T.L. **Doenças do eucalipto – *Eucalyptus* spp.** In: GALLI, F. Manual de fitopatologia, São Paulo, Agroceres, 1980, v. 2, p. 275-296.

KRUGNER, T.L.; AUER, C.G. **Doenças dos eucalipto**. In: BERGANI FILHO, A. Manual de fitopatologia, São Paulo, Agroceres, 1995, capítulo 36, p. 319-332.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAM, E.; KATO, N.; LAWTON, M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. **Nature**, London, v. 411, n. 6839, p. 848-853, 2001.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Phisyology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, p. 251-575, 1997.

LANGEN, H.; TAKACS, B.; EVERS, S.; BERND, T.P.; LAHM, H.W.; WIPF, B.; GRAY, C.; FOUNTOULAKIS, M. Two-dimensional map of the proteome of Haemophilus influenzae. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 411-429, 2000.

LEÓN-GALLEGOS, H.M.; CUMMIS, G.B. Uridinales (royas) de Mexico. v. 1, *Puccinia*, **Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos de Mexico**, Culiacán, Sinaloa, Mexico, 1981.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis. I. Gene products are where the biological action is. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 191-202, 1999.

MAC LACHLAN, J.D. The pimento rust disease. **Journal of Jamaica Agricultural Society**, Kingston, n. 40, p. 277-281, p.1936.

MAC LACHLAN, J.D. A rust of pimento tree in Jamaica. **Phytopathology**, St. Paul, n. 28, p. 157-170, 1938.

MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Principio de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. In: De J. L. de Azevedo, M. L. R. Aguiar-Perecin e N. A. Velho. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.

MARLATT, R.B.; KIMBROUGH, J.W. *Puccinia psidii* on *Pimenta dioica* in south Florida. **Plant Disease Reporter**, New York, n.63, p. 510-512, 1979.

MAYER, E. Contribution à l'étude des Uredinées de Colômbia. Mémoires de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturalles, França, n. 5, p. 442-599, 1913.

MENDGEN, J.; OHAYON, H. GOUNON, P.; MEGE, R. M.; COSSART, P. Ecadherins is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenese* into epithelial cells. **Cell**, Cambridge, n. 84, p. 923-932, 1996.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 8, p. 352-356, 2002.

MENON, H.B. El cultivo del guayabo. **AgricultorVenezuelano**, n. 15, p. 43-47, 1950.

MIREKU, E.; SIMPSON, J.A. Fungal and nematode threats to Australian forests and amenity trees from importation of wood and wood products. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Canada, n. 24, p. 117-124, 2002.

MOON, D. H.; SALVATIERRA, G. R.; CALDAS, D. G. G.; GALLO DE CARVALHO, M. C. C.; CARNEIRO, R. T.; FRANCESCHINI, L. M.; ODA, S.; LABATE, C. A. Comparison of the expression profiles of susceptible and resistant *Eucalyptus grandis* exposed to *Puccinia psidii* Winter using SAGE. **Functional Plant Biology**, Collingwood, n. 34, p. 1010-1018, 2007.

NAVARATNAM, S.J. Quarterly Newsletter, Asia and Pacific **Plant Protection Commission Plant Quarantine**, Australia v. 29, 1986, vol 1.

NIKS, R.E. Haustorium formation by *Puccinia psidii* in leaves of hypersensitive, partially resistant and nonhost plant genotypes. **Phytopathology**, St. Paul, n. 73, p. 64-66, 1983.

NORTHCOTE, D.H. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 23, p. 113-132, 1972.

NÜRNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, Kidlington, n. 6, p. 372-379, 2001.

O'FARREL. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.250, n.10, p. 4007-4021, 1975.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Disponível em: www.fao.org.br/noticias.asp, acessado em 14 janeiro de 2008.

PARKER, K. C.; GARRELS, J. I.; HINES, W.; BUTLER, E. M.; MCKEE, A. H.; PATTERSON, D.; MARTIN, S. Identification of yeast proteins from two-dimensional gels: working out spot cross-contamination. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 19, p. 1920-1932, 1998.

PLOMION, C.; LEPROVOST, C.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, p. 1513-1523, 2001.

POWELL, A.; STOTZ, H.; LABAVITCH, J.; BENNET, A.1995. Glycoprotein inhibitors of fungal polygalacturonases. In: OSBORNE, A. (Ed). **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Kluwer: Academic Publishers, 1985. v 3 399p.

PRYOR, L.D. Selecting and breeding for cold resistance in *Eucalyptus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 6, p. 98-109, 1957.

QUOIRIN, M.; VIEIRA, R.C. Rhizogenesis and nodule formation from callus of *Eucalyptus grandis*, and *E. grandis* X *E. urophylla*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n. 3, p. 793-798, 1995.

RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N.V.; MCCALLUM, B.; BEIMCIK, E.; ENS, W. Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 1897-1907, 2006.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of plants**. New York: Worth Publ., 2001. 791 p.

RAYACHHETRY, M.B.; VAN, T.K.; CENTER, T.D.; ELLIOTT, M.L. Host range of *Puccinia psidii*, a potential biological control agent of *Melaleuca quinquenervia* in Florida. **Biological Control**, Santiago, n. 22, p. 38-45, 2001.

RIBEIRO, I.J.A.; POMMER, C.V. Breeding guava (*Psidium guajava*) for resistance to rust caused by *Puccinia psidii*. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 632, p. 75-78, 2004.

RICHTER, T.E.; RONALD, P.C. The evolution of disease resistance gene. **Plant Molecular Biology**, The Hague, n. 42, p. 407-414, 2000.

RIDLEY, G.S.; BAIN, J.; BULMAN, L.S.; DICK, M.A.; KAY, M.K. Threats to New Zealand's indigenous forests from exotic pathogens and pests. **Science for Conservation**, Department of Conservation Wellington, New Zealand, n. 142, 2000.

RUGGERI, P. Contributo alla cariologia del genere *Eucalyptus* (Myrtaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 14, p. 111-120, 1961.

RUIZ R.A.R., ALFENAS A.C., MAFFIA L.A., BARBOSA M.N. Progresso da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v.14, p. 73-81, 1989.

RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A.; VALLE, F.X.R. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 14, p. 55-61, 1989a.

SCHULZE-LEFERT, P. Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistence to biotrophic fungi at the cell wall, **Current Opinion in Plant Biology**, London, n. 7, p. 377-383, 2004.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells disease resistence. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n. 41, p. 641-667, 2003.

SCHIEBER, E.; SÁNCHEZ, A. Lista preliminary de la enfermedades de las plantas in Guatemala. **Boletín Técnico Ministerio Agricultura Guatemala**, Guatemala, n. 25, p. 1-56, 1968.

SEAVER, F.J.; CHARDÓN, C.E. Botany of Porto Rico and the Virgin Islands. **Mycology Scientific Survey of Porto Rico and Virgin Islands**, Porto Rico, n. 8, p. 1-208, 1926.

SELVENDRAN, R.R.; O'NEILL, M.A. **Isolation and analysis of cell walls from plant material**. In: Methods of Biochemical Analysis. Vol. 32. Edited by Glich, D, 1987, pp 25-153. John Wiley & Sons, London

SHUTHERLAND, M.W. The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. **Physiological and Plant Pathology**, London, v. 37, p. 79-93, 1991.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N.; CAMARGO, F.R.A.; SILVA, C.R. **Resultados preliminares do projeto "Influencia do estado nutricional do *Eucalyptus* na predisposição à ocorrência da ferrugem (*Puccinia psidii*)**. 1998. 44p. (Relatório Técnico)

SIMPSON, J.A.; THOMAS, K.; GRGURINOVIC, C.A. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, n. 35, p. 549-562, 2006.

SOCIEDADE BRASIELIRA DE SILVICULTURA. Fatos e números do setor florestal do setor brasileiro. Disponível em: www.sbs.org.br/RelatorioAtividadesSBS2006a.pdf, acessado em 14 janeiro de 2008.

SPEGAZZINI, C.L. Fungi Guaranitici. Pugillus 1. **Annales de la Sociedad Científica Argentina**, Buenos Aires, n. 17, p. 119-134, 1884.

SPEGAZZINI, C.L. Fungi Paraguayensis. **Annales Del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires**, Buenos Aires n. 31, p. 355-450, 1922.

SPEGAZZINI, C.L. Fungi Puiggariani. Pugillus 1. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Cordoba**, Cordoba n. 11, p. 378-622, 1889.

STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J. ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 268, p. 661-667, 1995.

STEVENSON, J.A. Foreign plant disease. A manual of economic plant disease which are new or not widely distributed in the United State. **United State Departament of Agriculture**. Washington DC: Federal Horticulture Broad, 1926, vol 1.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L. e ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre: ArtMed, 2004. capítulo 13, p. 309-334.

TAYLOR, J.; MIMS, C. W. Fungal development and the host cell responses to the rust fungus *Puccinia substriata* var. *indica* in seedling and mature leaves of susceptible and resistant pearl millet. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, n. 69, p. 1207-1219, 1991.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **TAPPI. Test method T249 cm-85**: carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography. Atlanta, 1991. 1v.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T222 om-88**: acid insoluble lignin wood and pulp. Atlanta, 1996. 1v.

TELECHEA, N.; ROLFO, M.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, M.J. *Puccinia psidii* on Eucalyptus globules in Uruguay. **Plant Pathology**, Oxford, n. 52, p. 427, 2003.

TESSMANN, D.J.; DIANESE, J.C. Hentriacotane: a leaf hydrocarbon from *Syzygium jambos* whit stimulatory effects on the germination of uredinispores of *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 538-542, 2002.

THARA, V.K.; FELLERS, J.P.; ZHOU, J.M. In planta induced genes of *Puccinia triticina*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, n. 4, p. 51-56, 2003.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins targets, mechanisms and prospective applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, n. 61, p. 437-455, 2004.

TOMMERUP, I.C.; ALFENAS, A.C.; OLD, K.M. Guava rust in Brazil – a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. **New Zealand Journal of Forestry Science**, New Zealand n. 33, v. 3, p. 420–428, 2003.

TWYMAN, R.M. **Principles of proteomics**. Advanced Text, UK, 2004. 241 p.

VALVERDE, S.R.; OLIVEIRA, G.G.; CARVALHO, R.M.A.M.; SOARES, T.S. Efeito multiplicadores do setor florestal na economia capixaba. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 85-93, 2005.

WALKER, J. Pacific mycogeography: deficiencies and irregularities in the distribution of plant parasitic fungi. **Australian Journal of Botany Supplementary Series**, n.10, p. 89–136, 1983.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, 1995.

WINTER, G. Rabenhorstii fungi et extraeuraopaei exsiccate cura Dr. G. Winter. **Centúria XXXI et XXXII**, Hedwigia, n. 23, p. 164-172, 1884.

YORINORI, J.T.; PAIVA, W.M.; FREDERICK, R.D.; FERNANDEZ, P.F.T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2., Foz do Iguaçu, 2002. **Resumos**, Foz do Iguaçu, 2002. p. 94.

XAVIER, A.A.; ALFENAS, A.C.; MATSUOKA, K.; HODGES, C.S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, n. 30, p. 277–281, 2001.

ZHANG, L.; MEAKIN, H.; DICKINSON, M. Isolation of gene expressed during compatible interactions between leaf rust (*Puccinia psidii*) and wheat using cDNA-AFLP. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, n. 4, p. 469-477, 2003.

ZHOU W.; EUDES F.; LAROCHE A. Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. **Proteomics**, Weinheim, n. 6, v. 16, p. 4599-4609, 2006.