

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO



**ACTIVIDADE E POLIMORFISMO DA SUPERÓXIDO
DISMUTASE, CATALASE E PEROXIDASE DO ASCORBATO DE
FOLHAS DE *SOLANUM TUBEROSUM* L. TRATADAS COM
PHYTOPHTHORA INFESTANS EM SITUAÇÃO DE NÃO CARÊNCIA
HÍDRICA E CARÊNCIA HÍDRICA.**

Dissertação de Mestrado em
Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal
realizada por

Isabel Maria Filipe Fernandes

Porto, 2003

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Actividade e polimorfismo da superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato de folhas de *Solanum tuberosum* L. tratadas com *Phytophthora infestans* em situação de não carência hídrica e carência hídrica

Dissertação realizada para a candidatura a grau de
Mestre em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal
Submetida na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Realizado por
Isabel Maria Filipe Fernandes

Sob orientação de
Professora Doutora Isabel Santos

RESUMO

As plantas estão frequentemente sujeitas a situações de stresse nomeadamente o ataque de patogénios e a secura. Estas situações de stresse, provocam variadas alterações morfológicas e bioquímicas como a explosão oxidativa com a formação de Espécies Reactivas de Oxigénio. Estas espécies são extremamente reactivas e tóxicas para as células quando presentes em grandes quantidades. Desta forma, as plantas desenvolveram sistemas de defesa antioxidantes, que incluem compostos não enzimáticos e enzimáticos.

Neste trabalho, o comportamento a nível de actividade e padrão isoenzimático, de algumas enzimas do sistema antioxidante - superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX)- foi estudado em folhas de *Solanum tuberosum* L. crescidas em condições de não carência hídrica e de carência hídrica e tratadas com *Phytophthora infestans*.

A actividade das enzimas SOD e APX foi determinada por espectrofotometria sendo a actividade da CAT quantificada por polarografia. As diferentes isoenzimas foram avaliadas pela detecção da sua actividade após electroforese. A peroxidação lipídica foi um parâmetro indicador do grau de stresse oxidativo.

Em plantas não sujeitas a carência hídrica nem à infecção pelo patogénio foram detectadas seis isoformas da enzima SOD sendo cinco Cu/ZnSOD e uma FeSOD. Após um dia de infecção com o patogénio, não se verificou alteração do padrão isoenzimático. Resultado diferente foi detectado após quatro dias de infecção onde surgiram duas novas isoformas, uma Cu/ZnSOD e uma FeSOD, quer na situação controlo quer na situação de infecção. Nas plantas sujeitas a falta de água surgiram, na situação controlo e na situação de infecção, três novas isoformas, duas Cu/ZnSOD e uma FeSOD.

Detectaram-se duas isoformas de CAT, CAT-1 e CAT-2, apresentando a primeira mais actividade em todas as situações estudadas. Em plantas não sujeitas a carência hídrica após um dia de tratamento com o patogénio, verificou-se um aumento de actividade das duas isoformas, no entanto, após quatro dias a actividade diminuiu, principalmente ao nível da CAT-2. Esta diminuição também se verificou em plantas sujeitas a carência hídrica após um dia de tratamento.

As plantas não sujeitas a carência hídrica nem a infecção apresentaram duas isoformas da APX- APX-1 e APX-2. Após um dia de tratamento com o patógeno verificou-se um aumento de actividade da APX-1 e o aparecimento de uma nova isoforma, a APX-3. Quatro dias após tratamento com o patógeno, verificou-se uma diminuição de actividade da APX-1 e um aumento de actividade da APX-2. Nas plantas controlo para quatro dias de infecção surgiu uma nova isoforma, a APX-4, que não foi detectada no material infectado. Em plantas sujeitas à falta de água, após um dia de tratamento com o patógeno, verificou-se um aumento de actividade da APX-1.

A actividade da GPX (peroxidase do guaiacol), enzima envolvida em alguns processos de defesa contra patógenos, aumentou após infecção.

O tratamento com o patógeno causou um aumento da peroxidação lipídica nas plantas não sujeitas a carência hídrica, no entanto, nas plantas sujeitas a carência hídrica os níveis não sofreram alterações significativas.

A análise dos resultados obtidos sugere que plantas sujeitas a carência hídrica activam os sistemas antioxidantes tornando assim as células mais eficientes na defesa contra um outro stresse que, no presente estudo, foi a infecção pelo patógeno. Esta observação leva a considerar a existência de elementos comuns na resposta ao stresse provocado pelo patógeno e pela secura.

ABSTRACT

Plants are frequently affected by adverse environmental conditions like pathogen attack and drought. These stress situations cause physiological modifications in cells, as the oxidative burst with a consequent production of reactive oxygen species (ROS). These species, when in large quantities, are extremely reactive and toxic to the cells. In this way plants have developed antioxidant systems, which include metabolites with antioxidant properties and protective enzymes.

In this work, the activity and pattern of isozymes of the antioxidant system - superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX)- were studied in leaves of *Solanum tuberosum* L. grown under normal conditions and grown under drought, after treatment with *P. infestans*.

The activity of SOD and APX was determined by espetrofotometry while CAT activity was determined by polarographic method. The isozymes were detected in native gel after electrophoresis. Lipid peroxidation was used as an indicator of the oxidative stress in plants.

In control plants (watered and not infected) were detected six isozymes of SOD, five of them were identified as Cu/Zn SOD and one was a FeSOD. After one-day-treatment with *P. infestans*, there were not any modifications in the isozymes pattern. A different result was detected after a four-day-treatment with the pathogen, where appeared two new isozymes, one Cu/Zn SOD and one Fe SOD, in both control and infected situation. In plants subjected to drought, appeared three new isozymes, two Cu /Zn SOD and one FeSOD, in both control and infected situation.

There were detected two isozymes of CAT, CAT- 1 e CAT-2, the latter showing more activity in all the studied situations. In plants not subjected to drought, after one-day-treatment with pathogen, the activity of the two isozymes increased. On the other hand, after a four-day-treatment, the activity of these isozymes decreased, mainly CAT-2. This decrease due to pathogen was also revealed in plants subjected to drought after one-day-treatment.

The control plants showed two APX isozymes- APX1, APX2. After one-day-treatment with pathogen the activity of APX-1 increased and was observed a new isozyme, APX-3. After four-day-treatment with pathogen, it was observed a decrease in the APX-1 activity and a increase in the APX-2 activity. In control plants after a four-

day-treatment it was observed a new isozyme, APX-4. In plants subjected to drought, after one-day-treatment with pathogen, it was observed a increase in APX-1 activity.

The GPX activity (guaiacol peroxidases), involved in some defense processes against pathogens, increased after infection.

The treatment with pathogens caused a increase in lipid peroxidation in plants not subjected to drought, meanwhile, plants subjected to drought did not show significant changes.

These results demonstrate that plants subjected to drought activate the cell antioxidant systems that may protect them against other stresses that in the present study was the pathogen infection. This observation suggests the existence of common elements between the stress response to pathogens and the stress response to drought.

AGRADECIMENTOS

A realização de um trabalho, qualquer que seja a sua natureza, nunca se limita a uma só pessoa. Todo o trabalho necessita da colaboração de diversas pessoas que, através do seu saber científico e/ou prático, ou pela sua ajuda e apoio tornaram possível a sua realização. Neste sentido esta página serve, sobretudo, para lhes prestar a minha homenagem e para deixar os meus sinceros agradecimentos.

Antes de mais, gostaria de agradecer à Professora Doutora Isabel Santos por todo o apoio prestado, pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade sempre demonstrada ao longo de todo o trabalho.

Ao Dr. José Manuel Almeida por todo o acompanhamento, pelo rigor, espírito científico e boa disposição criada durante a parte laboratorial do trabalho.

À D. Isabel pela disponibilidade e simpatia sempre demonstrada ao longo deste ano.

Gostaria também de agradecer a todos os meus colegas de mestrado e de laboratório, nomeadamente à Sabina Gomes, à Raquel Figueiredo, ao José Carlos, à Iolanda, à Ana Confraria e ao Júlio Santos, pelo companheirismo e ajuda disponibilizada. Uma palavra de agradecimento também para todos os outros que, de alguma forma me ajudaram a concretizar este trabalho.

A todos os que me são mais próximos, em especial, aos meus pais e avós.

Ao Bruno, por tudo...

ABREVIATURAS

AA	Ascorbato
APS	Persulfato de Amónio
APX	Peroxidase do Ascorbato
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
BHY	Hidroxitolueno Butilato
CAT	Catalase
Chl	Clorofila
CN ⁻	Ião Cianeto
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTE	Cadeia Transportadora de Electrões
DHA	Desidroascorbato
DHAR	Redutase do Desidroascorbato
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ERO	Espécies Reactivas de Oxigénio
Fd	Ferredoxina
GPX	Peroxidase do Guaiacol
GR	Glutathiona Redutase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
HCl	Ácido Clorídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
MDHA	Monodesidroascorbato ou Malondialdeído
MDHAR	Redutase do Monodesidroascorbato
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NBT	Nitroazul de Tetrazolio
Na ₂ - EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético Dissódico
NADP ⁺	Nicotiamina Adenina Dinucleotido Fosfato (Forma Oxidada)
NADPH	Nicotiamina Adenina Dinucleotido Fosfato (Forma Reduzida)

O ₂	Oxigénio Molecular
¹ O ₂	Singlete de Oxigénio
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxilo
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
P-HMB	Fluoreto de Hidroximetilsulfonilo
PMSF	Fenilmetilsulfonil Fluoreto
PS I	Fotossistema I
PS II	Fotossistema II
PVP	Polivilpirrolidona
PX	Peroxidase
RH	Resposta de Hipersensibilidade
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por Minuto
Rubisco	Ribulose 1,5-Bifosfato Carboxilase/ Oxidase
SOD	Superóxido Dismutase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TEMED	Tetrametiletenodiamina
Tris	Tris (Hidroximetil) Aminometano

ÍNDICE

I- Introdução-----	1
1- Espécies reactivas de oxigénio-----	2
2- Mecanismos de defesa antioxidantes-----	11
2.1- Sistemas antioxidantes enzimáticos -----	12
2.1.1- Superóxido dismutase-----	13
2.1.2- Catalase -----	20
2.1.3- Peroxidases -----	20
2.1.3.1- Peroxidase do ascorbato -----	20
2.1.3.2- Peroxidase do guaiacol -----	25
2.2- Sistemas antioxidantes não enzimáticos -----	27
3- Consequências do disparo oxidativo -----	29
4- Mecanismos de defesa da planta face ao ataque de patogénios-----	39
5- Mecanismos de defesa da planta face à secura -----	44
6- Tolerância cruzada -----	46
7- <i>Solanum tuberosum L.</i> -----	48
8- <i>Phytophthora infestans</i> -----	50
9- Objectivo -----	53
II - Material a métodos-----	54
1- Material Biológico- condições de crescimento e inoculação -----	54
2- Extracção enzimática-----	55
2.1- Catalases-----	55
2.2- Superóxido dismutase -----	56
2.3- Peroxidases -----	56
3- Actividade enzimática e polimorfismo em gel nativo de poliacrilamida ----	57
3.1- Actividade e polimorfismo da CAT -----	57
3.2- Actividade e polimorfismo da SOD -----	57
3.3- Actividade e polimorfismo da APX -----	58
4- Actividade enzimática por métodos bioquímicos -----	60
4.1- Actividade da CAT ao eléctrodo do oxigénio- -----	60
4.2 – Actividade da SOD ao espectrofotómetro -----	60

4.3- Actividade da APX ao espectrofotómetro -----	61
4.4- Actividade da GPX ao espectrofotómetro-----	61
5- Quantificação de proteínas -----	62
6- Extracção de proteínas solúveis -----	62
7- SDS-PAGE- electroforese em gel desnaturante -----	63
8- Peroxidação lipídica -----	64
9- Preparação de folhas para observação ao MO e ME-----	64
10 - Análise densitométrica dos geles -----	65
11- Análise estatística da actividade enzimática -----	65
III - Resultados e discussão-----	66
1- Actividade e polimorfismo da superóxido dismutase-----	68
2- Actividade da catalase-----	73
3- Actividade e polimorfismo de peroxidases-----	77
3.1-Peroxidase do Ascorbato-----	77
3.1- Peroxidase do Guaiacol -----	81
4- Proteínas solúveis -----	84
5- Peroxidação lipídica -----	86
6- Alterações citológicas em folhas-----	88
IV- Conclusão/ Perspectivas futuras-----	95
V – Bibliografia -----	97

I- INTRODUÇÃO

As plantas estão frequentemente sujeitas a situações de stresse, ou seja, a situações exteriores que afectam negativamente o seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Estes stresses podem ser **bióticos**, quando impostos por outros organismos, ou **abióticos**, quando são provocados por excesso ou carência de um factor ambiental (Bray *et al.*, 2000). Entre os seres vivos que provocam danos nas plantas encontram-se parasitas como vírus, bactérias, fungos, nemátodes, insectos e mesmo outras plantas. Entre as condições ambientais que prejudicam as plantas estão, o excesso ou a carência de água, a exposição a temperaturas muito altas ou baixas, a salinidade, o excesso ou falta de alguns nutrientes minerais, entre outros (Bray *et al.*, 2000).

O estilo de vida sésil das plantas terrestres, implica que as situações adversas sejam rapidamente e eficientemente reconhecidas, distinguidas e que sejam desencadeadas reacções de defesa gerais ou específicas (Langebartels *et al.*, 2002).

Existem vários factores que determinam a resposta da planta como o seu genótipo, o estado de desenvolvimento, a duração e a severidade do stresse, o número de vezes que a planta é sujeita ao stresse, a combinação de dois ou mais stresses entre outros. Assim, e de acordo com todas estas características a planta ou desenvolve defesas e supera os danos provocados pelo stresse ou fica susceptível, enfraquece podendo mesmo morrer (Bray *et al.*, 2000) (fig. 1).

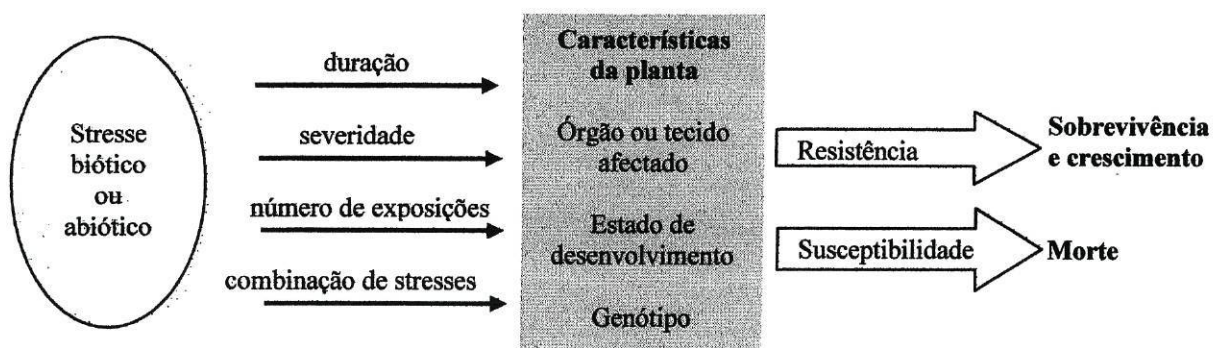


Fig. 1– Factores que determinam a resposta da planta a condições de stresse (adaptado de Bray *et al.*, 2000)

1- Espécies reactivas de oxigénio

As espécies reactivas de oxigénio, as EROs, são produzidas normalmente em várias vias metabólicas das plantas, em particular na fotossíntese e na respiração, em quantidades muito baixas. No entanto, quando as plantas estão sujeitas a um ou mais factores de stresse, ocorrem alterações das vias metabólicas, que podem levar a um aumento dramático da produção destas EROs, denominado por **disparo oxidativo**, que sujeita as células a um **stresse oxidativo** (Doke, 1997; Langebartels *et al.*, 2002) (fig. 2).



Fig. 2 – Factores ambientais que aumentam a concentração de espécies reactivas de oxigénio nas células das plantas (adaptado de Bray *et al.*, 2000).

As EROs resultam de alterações químicas do oxigénio molecular. A acumulação deste gás na atmosfera da Terra, permitiu a evolução dos organismos aeróbios que usam o oxigénio como o aceitador final de electrões, o que permitiu a obtenção de uma elevada fonte de energia quando comparado com a fermentação ou a respiração anaeróbia (Scandalios, 1993).

A utilização do oxigénio pelos seres vivos é feita através de reduções até se formar água. Durante estas reacções, vários intermediários parcialmente reduzidos são gerados, formando EROs (Scandalios, 1993). A conversão do oxigénio molecular em espécies reactivas de oxigénio resulta da adição de um, dois ou três electrões que forma respectivamente radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo (OH) (Mehdy, 1994) (fig. 3).

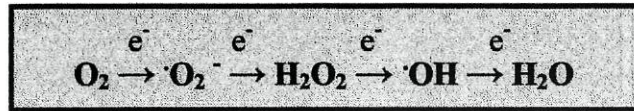


Fig. 3 – Vias de redução do oxigénio molecular até à produção de uma molécula de água com a formação de vários intermediários reactivos de oxigénio; e^- electrão (adaptado de Scandalios, 1993).

Sob forma molecular, o oxigénio é pouco reactivo, no entanto, em estados excitados é capaz de originar as EROs que, podem reagir com muitos componentes celulares, afectar diversos processos celulares e mesmo levar à morte celular (Mittler *et al.*, 1999). Para além das EROs já descritas, existem outras moléculas produzidas a partir do oxigénio molecular como o singlete de oxigénio ou radicais hidroperóxidos (tabela 1).

Espécie reactiva de oxigénio	Representação molecular
Singlete de oxigénio	$^1\text{O}_2$
Radical superóxido	O_2^-
Radicais hidroperóxidos	$\cdot\text{HO}_2$
Peróxido de hidrogénio	H_2O_2
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$

Tabela 1- Nome e símbolo químico utilizado para representar algumas espécies reactivas de oxigénio.

Muitos estudos referem a existência de um grande número de mecanismos extracelulares e intracelulares responsáveis pela produção de EROs.

A **formação extracelular de EROs** ocorre principalmente ao nível da membrana plasmática por acção de NADPH oxidases, por exemplo, durante interacções incompatíveis entre plantas e patógenos (Lamb & Dixon, 1997). Inibidores químicos de NADPH oxidases como o difenileno de iodo (DPI), mostraram ser capazes de diminuir ou mesmo impedir a produção de EROs (Mithofer *et al.*, 1997; Allan & Fluhr, 1997; Geethe & Shetty, 2002), o que indicou que as EROs eram, em grande parte, provenientes da acção destas oxidases da membrana. Estudos realizados por Doke e Miura (1995), em tecido de batateira *in vitro*, demonstraram que após inoculação com *Phytophthora infestans* ocorria um aumento de actividade de NADPH oxidases,

referindo mesmo, que esta enzima seria activada tanto por infecções como por eliciadores. Outras oxidases podem intervir na produção de EROs, como a oxidase do oxalato, que catalisa a conversão do oxalato em CO_2 e H_2O_2 ou as oxidases de aminas, que catalisam a oxidação de uma grande variedade de aminas, nos aldeídos correspondentes, com a libertação de NH_3 e H_2O_2 (Vranová *et al.*, 2002).

Para além destas fontes extracelulares, existem fontes intracelulares de EROs nomeadamente nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos peroxissomas e em outros compartimentos celulares (fig. 4).

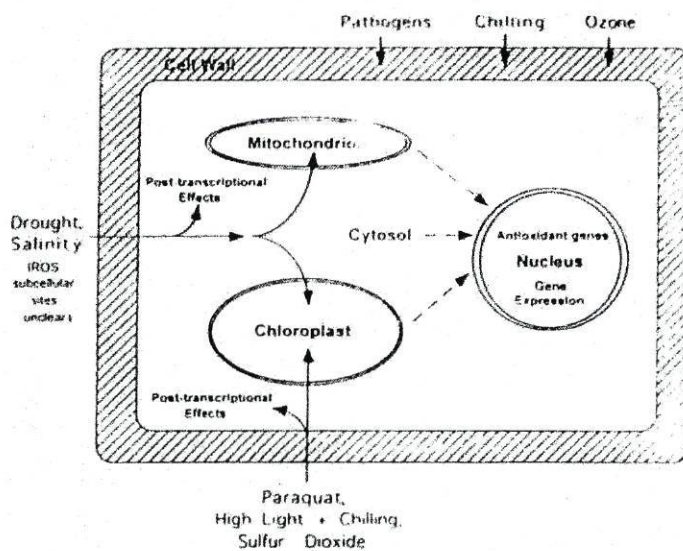


Fig. 4 - Locais de produção e desintoxicação de EROs em células vegetais (retirado de Alscher *et al.*, 1997).

CLOROPLASTOS

Os cloroplastos são importantes fontes de EROs uma vez que é nestes organelos que as concentrações de oxigénio são mais elevadas (Bartosz, 1997). Nestas estruturas celulares, a clorofila e outros pigmentos encontram-se nos tilacoides, organizados em unidades denominadas fotossistemas I e II (PS I e PS II). Quando as clorofilas destes fotossistemas absorvem energia, um dos seus electrões fica num nível superior de energia e é transferido para um aceitador primário de electrões. Este, por sua vez, transfere os seus electrões extra, para aceitadores secundários e assim sucessivamente ao longo da cadeia transportadora de electrões que inclui moléculas como quinonas, citocromos entre outras (Raven *et al.*, 1999) (fig. 5).

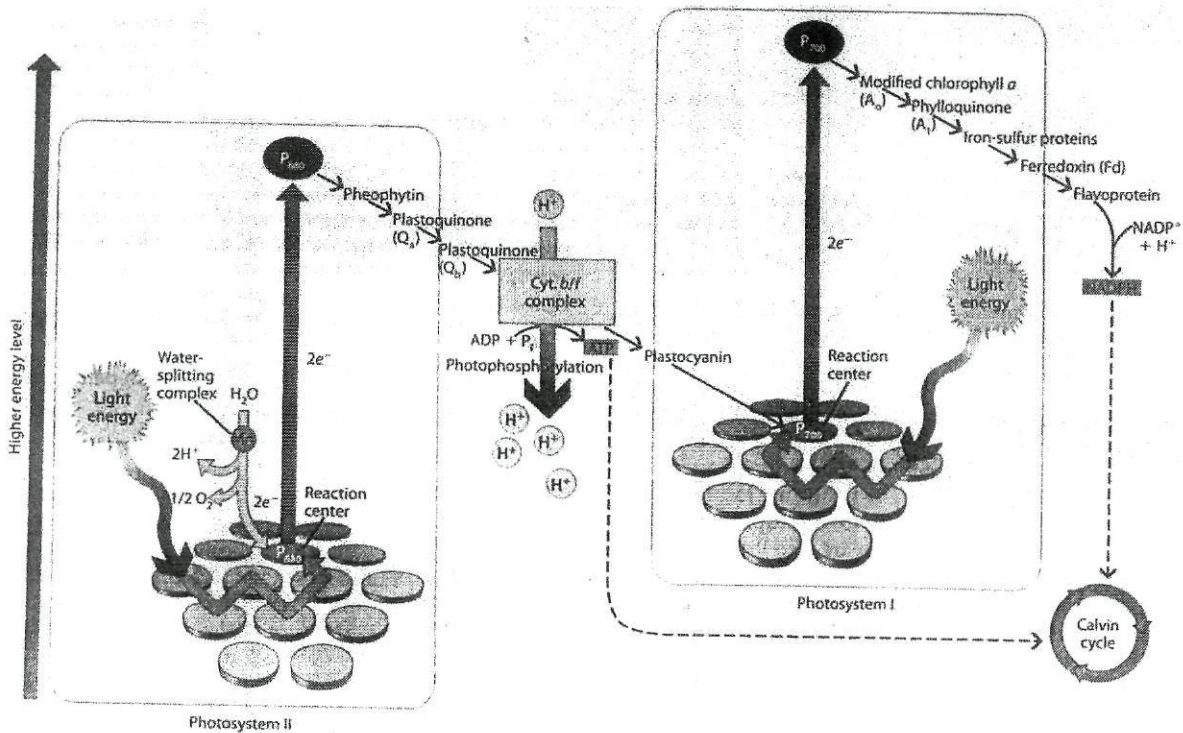


Fig. 5 – Esquema representativo do trabalho conjunto dos dois fotossistemas: o fluxo não cíclico de elétrons e a fotofosforilação. P 680 e P 700 representam clorofilas que constituem o centro de reação e fornecem elétrons à cadeia de elétrons do fotossistema II e I respectivamente. A feofitina, a plastoquinona, o complexo citocromo b/f, a plastocianina, a ferredoxina, a flavoproteínas, as proteínas de ferro e enxofre são aceitadores de elétrons (retirado de Raven *et al.*, 1999).

Este fluxo contínuo de elétrons provenientes da água que passa pelo PSII, PSI até ao NADP⁺, resulta na oxidação da água a oxigénio e na redução de NADP⁺ a NADPH (Raven *et al.*, 1999). Os prótons resultantes da fotólise da água (fig. 6), são bombeados através da membrana do tilacoide para o lúmen do tilacoide produzindo um gradiente de prótons muito importante na formação de ATP (Raven *et al.*, 1999)(fig. 5).

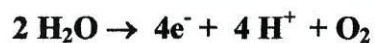


Fig. 6- Esquema da protólise da água. Moléculas de água originam elétrons, prótons e moléculas de oxigénio.

O ATP e o NADPH gerados por este transporte de elétrons e pela fotofosforilação, são posteriormente utilizados na assimilação do Carbono pelo Ciclo de Calvin (Foyer, 1997).

Numa situação considerada normal, os electrões da cadeia fotossintética são utilizados no processo de assimilação de CO_2 , na fotorespiração e na reacção de Mehler (Haupt-Herting & Fock, 2002), no entanto, em situações de stresse, pode ocorrer aumento de produção de várias EROs nos cloroplastos que, potencialmente, pode afectar muitos processos celulares. Neste organelo, pode ocorrer a produção de várias EROs como o radical superóxido, o peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo e singlete de oxigénio.

Formação de radical superóxido

O radical superóxido é produzido nos cloroplastos pela fotoredução do PS I e do PS II (Martinez *et al.*, 2001). Quando, por exemplo, a capacidade de transporte de electrões excede a capacidade de assimilar o CO_2 , pode ocorrer o desvio de electrões na cadeia transportadora de electrões para outro aceitador que não o NADP^+ que, caso seja o oxigénio, pode levar à formação do radical superóxido (Bowler *et al.*, 1992). A fotoredução do oxigénio molecular no PSI a partir de electrões provenientes do PS II denomina-se de reacção de Mehler (fig. 7) (Noctor & Foyer, 1998).

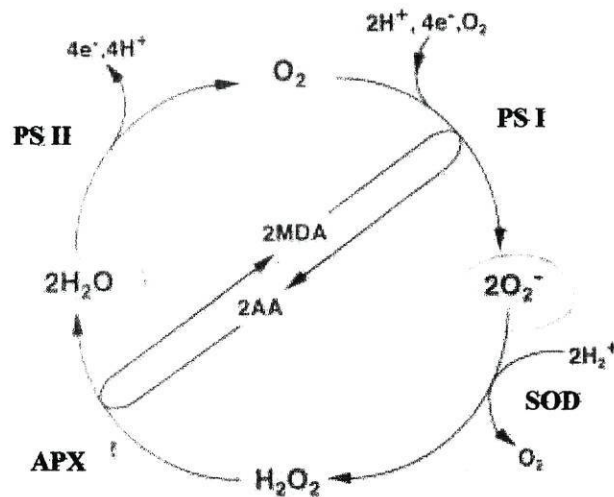


Fig. 7- Representação esquemática do ciclo da água associada com a reacção de Mehler e algumas enzimas do sistema antioxidante como a SOD e a APX. No PS I o oxigénio molecular é reduzido por electrões provenientes do PS II a radicais superóxido. Outros electrões do PSII podem interagir directamente como H_2O_2 formando água. Os radicais superóxido formados podem ser transformados em H_2O_2 pela enzima SOD e o H_2O_2 pode ser reduzido a água pelo ascorbato numa reacção catalisada pela APX (retirado de Foyer *et al.*, 1997).

Este sistema de fotoredução do oxigénio em água nos cloroplastos denomina-se ciclo da água, uma vez que os electrões derivados da água no PS II são utilizados na

redução do oxigénio a água no PS I (Asada, 1997). A função fisiológica deste ciclo é eliminar rapidamente e eficazmente o O_2^- e o H_2O_2 dos locais onde eles são formados de maneira a evitar a sua interacção com moléculas alvo (Asada, 1999).

Formação de peróxido de hidrogénio

O H_2O_2 pode ser formado espontaneamente ou com intervenção da enzima SOD a partir do radical superóxido (Martinez *et al.*, 2001). Esta molécula, também pode ser formada pela RuBisCo, quando esta desempenha função de oxigenase, uma vez que actua sobre o 3O_2 originando H_2O_2 . A formação desta ERO também pode ocorrer pela reacção do O_2^- com NAD(P)H oxidases.

Formação do radical hidroxilo

O radical hidroxilo pode ser formado pela interacção do H_2O_2 com moléculas redutoras, como iões metálicos, como o Fe^{2+} e o Cu^+ que, por sua vez, são gerados pela redução do Fe^{3+} e Cu^{2+} pelo O_2^- (Asada, 1999). A redução do H_2O_2 por iões metálicos com consequente produção do radical hidroxilo denomina-se de **reacção de Fenton** (fig. 8 (1)(2)(3)).

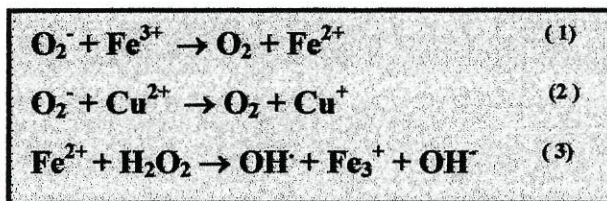


Fig. 8 – Reacção de Fenton. O O_2^- funciona como agente redutor de metais (1) (2), que por sua vez ao reagir com H_2O_2 originam radicais hidroxilo (3).

O radical hidroxilo pode também ser formado pela interacção do peróxido de hidrogénio com o radical superóxido na presença de iões metálicos. Esta reacção é denominada por **Reacção Haber- Weiss** (fig. 9).

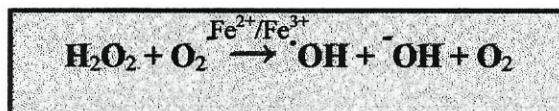


Fig. 9 – Reacção de Waber-Weiss.

Devido à sua extrema reactividade, o OH^\cdot é responsável por várias modificações celulares uma vez que este radical pode reagir indiscriminadamente com o DNA,

proteínas, lípidos e outras moléculas e, assim, iniciar um conjunto de reacções em cadeia que inclui a peroxidação lipídica, a inactivação enzimática ou a degradação de ácidos nucleicos (Mehdy, 1994; Grant & Loake, 2000).

Formação do singlete de oxigénio

O singlete de oxigénio pode ser formado também nos cloroplastos, quando a absorção de energia pela clorofila causa a sua transição para um estado excitado, por exemplo, para o estado de triplete-³Chl. Quando esta energia da clorofila é transferida directamente para o oxigénio pode ocorrer a formação do singlete de oxigénio a nível do PS II (Bowler *et al.*, 1992). Esta molécula é extremamente reactiva e pode transferir a sua energia de excitação a outras moléculas biológicas ou reagir com elas, causando-lhes alterações (Foyer, 2002). Esta molécula pode mesmo destruir as clorofilas do centro de reacção do PS II (Macpherson *et al.*, 1993).

MITOCÔNDRIAS

Outro organelo celular responsável pela produção de EROs nas células é a mitocôndria. A cadeia transportadora de electrões (CTE) deste organelo contribui em grande parte para a produção de EROs pela autooxidação de vários componentes como a ubiquinona ou o citocromo *c* (Moller, 2001). Esta CTE encontra-se na membrana interna da mitocôndria e envolve um vasto conjunto de enzimas, bombas de H⁺ e complexos respiratórios (fig. 10).

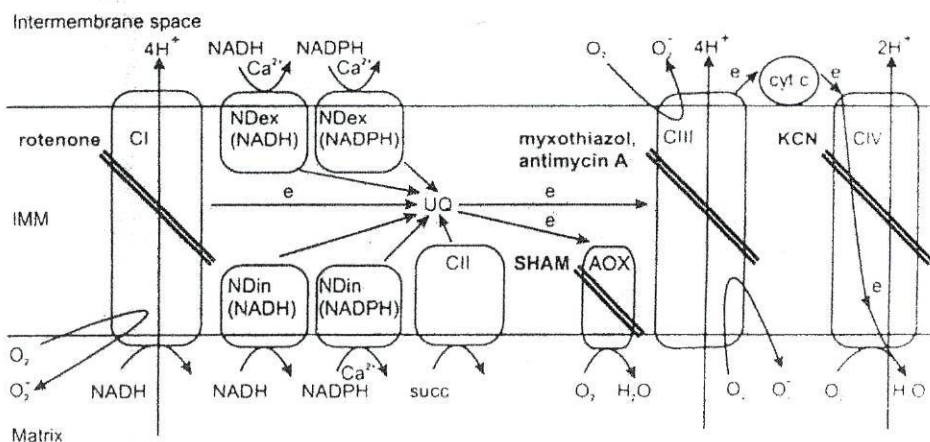


Fig. 10- Cadeia de transporte de electrões na membrana interna da mitocôndria de plantas. Estão representadas as enzimas, as bombas de H⁺, os complexos respiratórios I, II, III e IV e os respectivos inibidores. Abreviaturas: CI a CIV complexos respiratórios; CI- NADH desidrogenase; CII- succinato desidrogenase; CIII- ubiquinol- citocromo bc1 reductase; CIV-

citocromo *c* oxidase; cyt- citocromo; succ. -succinato; SHAM- ácido salicilhidroxâmico (retirado de Moller, 2001).

Formação de radical superóxido

Quando o oxigénio interacciona com duas oxidases do final da CTE, o complexo IV e a oxidase alternativa (AOX), quatro electrões são transferidos para O_2 e a água é o produto final (fig. 10). No entanto, durante a respiração, o oxigénio molecular pode sofrer reduções univalentes nos complexos I e III formando radicais superóxido que posteriormente se poderão converter em peróxido de hidrogénio (Tiwari *et al.*, 2002). O oxigénio pode também interagir com outros componentes reduzidos da cadeia transportadora de electrões como as flavinas, o citocromo ou a ubiquinona e, assim, levar à formação de EROs (Moller, 2001). Por exemplo, a ubiquinona rica em electrões, a ubisemiquinona, pode reduzir o O_2 a O_2^- (Cadena & Boveris, 1980). Este radical, sendo carregado, não atravessa a membrana da mitocôndria acumulando-se no seu interior.

Formação de peróxido de hidrogénio

O envolvimento directo da cadeia transportadora de electrões na formação de H_2O_2 foi provado pela adição de inibidores do complexo I e III (rotenona e antimicina respectivamente) juntamente com os substratos desses complexos. Nesta situação, a produção de H_2O_2 cessou quase por completo o que indicou que estes dois complexos eram na realidade os responsáveis pela produção do H_2O_2 (Tiwari *et al.*, 2002). A adição de catalase juntamente com substratos respiratórios diminuiu fortemente a oxidação de algumas moléculas, o que indicou que o H_2O_2 era a principal forma de ERO neste organelo (Tiwari *et al.*, 2002).

PEROXISSOMAS E GLIOXISSOMAS

Nas plantas, os peroxissomas das células levam a cabo as reacções de fotorespiração e contêm as enzimas da via do glicolato (Pastori & Del Rio, 1994). Estes organelos participam numa grande variedade de vias metabólicas, nomeadamente no armazenamento e biossíntese de lípidos, no metabolismo do colesterol e do dilichol, na β -oxidação ácidos gordos e no ciclo do glioxilato. Os peroxissomas envolvidos nestas duas últimas vias denominam-se glioxissomas (Bunkelmann & Trelease, 1996).

Formação de peróxido de hidrogénio

Nestes organelos, o H_2O_2 é produzido por oxidases que estão envolvidas na oxidação de uma grande variedade de biomoléculas. Estas oxidases, removem dois electrões dos substratos transferindo-os para o O_2 levando à formação de H_2O_2 (fig. 11) (Scandalios *et al.*, 1997). Alguns exemplos de oxidases envolvidas neste processo são a oxidase do glicolato, oxidases de D aminoácidos ou a oxidase de flavina (Asada, 1997).

O H_2O_2 também pode ser produzido na reacção de β -oxidação dos ácidos gordos ou ser produzido a partir de O_2^- numa reacção catalisada pela SOD.

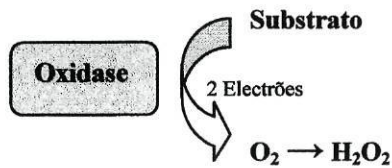


Fig. 11- Esquema representativo da acção das oxidases na produção de H_2O_2 .

Formação de radicais superóxido

A formação de radicais superóxido nos peroxissomas da folha é uma realidade e, os sistemas responsáveis pela sua produção são a xantina oxidase solúvel na matriz do peroxissomas e NADH oxidases da membrana, que usam o O_2 como aceitador de electrões produzindo O_2^- para o citosol (Del Rio *et al.*, 2002).

Neste organelo, ocorre a produção de uma outra molécula, o óxido de azoto (NO), pela acção da enzima NO sintetase (Barroso *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 2002). Este NO pode reagir com o O_2^- levando à formação de um outro forte oxidante, o peroxinitrito. O NO parece desempenhar um papel importante no dano celular, no entanto, esta molécula também parece ter um papel importante como molécula antioxidante. Estes diferentes papéis são dependentes da concentração desta molécula na célula (Beligni *et al.*, 2002).

OUTROS COMPARTIMENTOS CELULARES

In vitro já foi possível verificar a presença de pequenas quantidades de H_2O_2 no citosol, no retículo endoplasmático e no núcleo (Chance *et al.*, 1979). O H_2O_2 pode ser formado em reacções catalisadas por aminoxidases localizadas no espaço extracelular ou peroxidases localizadas na parede, cuja actividade é induzida pela alcalinização da parede celular (Allan & Fluhr, 1997).

Como se viu, nas plantas, quantidades significativas de EROs são produzidas em vários compartimentos celulares e organelos. Cada organelo tem alvos potenciais de stresse oxidativo e, desta forma, no sentido de se proteger, desenvolveu mecanismos eficazes para eliminar esses intermediários tóxicos (Scandalios, 1997).

2- Mecanismos de defesa antioxidante

Após exposição da planta a um ou vários stresses, a duração do disparo oxidativo bem como as suas consequências tóxicas, podem ser limitadas pela planta devido à presença de mecanismos capazes de neutralizar e remover as EROs. Através da pressão selectiva e da evolução, vários mecanismos de defesa (enzimáticos e não enzimáticos) surgiram no sentido de proteger as células contra o dano oxidativo (Scandalios, 1993). Estes mecanismos denominados **mecanismos antioxidantes** são possíveis devido à presença de moléculas de baixo peso molecular ou de enzimas especializadas na decomposição das EROs (Polle, 1997). Estes sistemas antioxidantes existem em vários compartimentos subcelulares incluindo o citosol, os cloroplastos, as mitocôndrias, os peroxissomas e os vacúolos (fig. 12) (Polle, 1997).

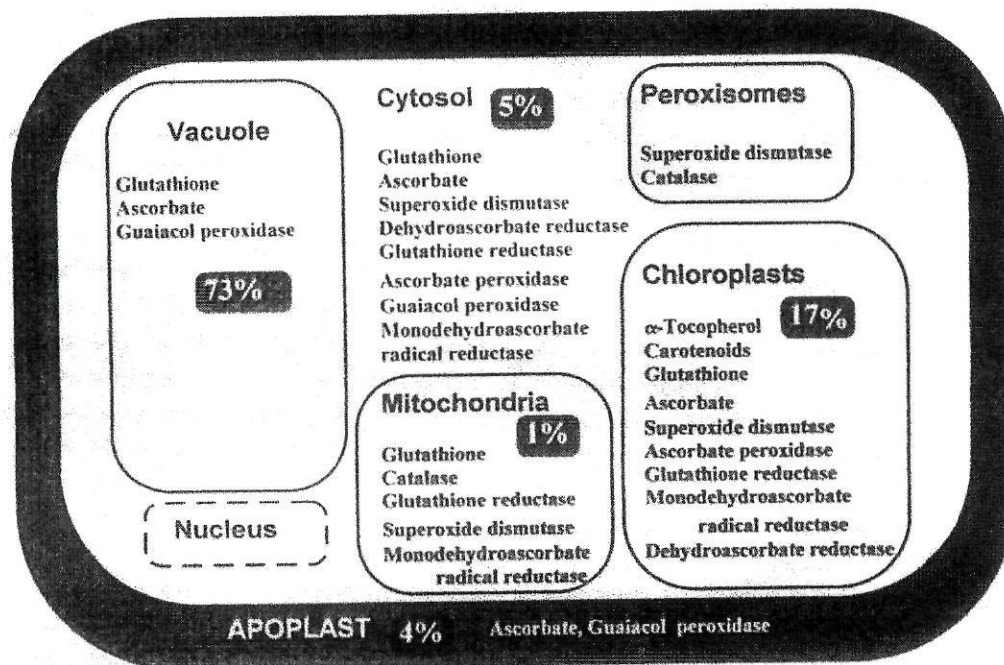


Fig. 12- Localização subcelular dos sistemas antioxidantes das células das plantas (retirado de Polle, 1997).

2.1- Sistemas antioxidantes enzimáticos

As defesas antioxidantes incluem enzimas capazes de remover, neutralizar ou eliminar os radicais livres e intermediários do oxigênio (Scandalios, 1993). Estas enzimas catalisam reduções, muitas das quais utilizam electrões fornecidos por compostos de baixo peso molecular como o ascorbato e a glutatona (Noctor & Foyer, 1998). O papel das enzimas antioxidantes em situações de stresse é o de controlar a acumulação de EROs e assim limitar o dano oxidativo (Noctor & Foyer, 1998). A tabela 2 descreve algumas das enzimas antioxidantes que têm sido mais bem caracterizadas.

Tabela 2- Enzimas antioxidantes (adaptado de Noctor & Foyer, 1998).

ENZIMAS	ABREVIATURA
Superóxido dismutase	SOD
Catalase	CAT
Peroxidase do ascorbato	APX
Peroxidase do Guaiacol	GPX
Monodesidroascorbato reductase	MDHAR
Desidroascorbato redutase	DHAR
Glutationa redutase	GR

Todas estas enzimas actuam de forma interligada sendo importante a compreensão das funções e interligações que desenvolvem na eliminação das EROs das células (fig. 13).

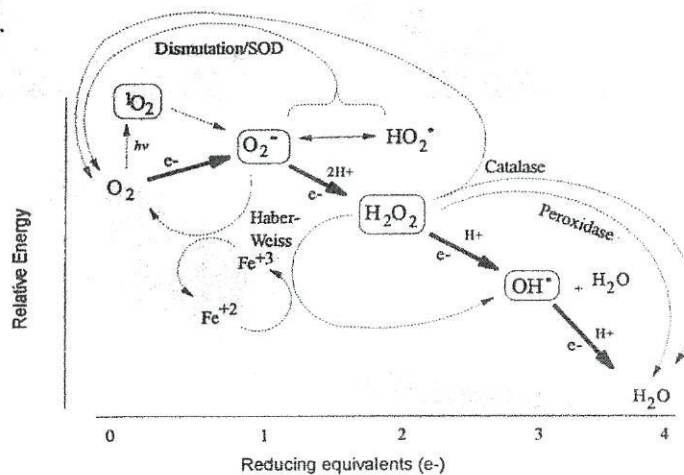


Fig. 13- EROs derivadas do oxigênio molecular, vias e enzimas envolvidas na interconversão das EROs até à formação de água (retirado de Baker & Orlando, 1995).

2.1.1-SUPERÓXIDO DISMUTASE- SOD

A SOD tem sido identificada como um componente essencial na defesa das plantas, sendo por isso uma das enzimas mais estudadas. Esta enzima foi pela primeira vez isolada em sangue bovino (Mann & Keilin, 1938), no entanto, a sua acção catalítica só foi descoberta nos anos sessenta por McCord e Fridovich (1969). Encontra-se presente na maior parte dos organismos aeróbios e em vários compartimentos celulares onde o stresse oxidativo pode surgir (Bowler *et al.*, 1992).

A SOD é uma metaloproteína multimérica que catalisa a dismutação de radicais superóxido em peróxido de hidrogénio e água (fig. 14) (Scandalios, 1993). A actividade desta enzima é elevada permitindo a transformação e eliminação deste radical de forma mais rápida ($2 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) do que se verifica através da dismutação espontânea ($2 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) (Polle, 1997).

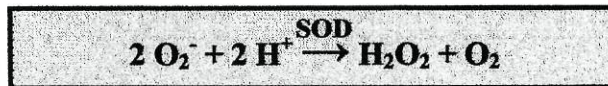


Fig. 14 – Reacção catalisada pela enzima SOD.

A SOD existe sob três formas classificadas de acordo com o metal que possui no seu centro activo. Se metal for o Cobre ou o Zinco, denomina-se de Cu/ZnSOD, se for o Ferro denomina-se de FeSOD e se o metal presente for o Manganês, denomina-se de MnSOD (Martinez *et al.*, 2001).

Em folhas de *Arabidopsis*, foi verificada a existência dos três tipos de SOD, cada uma delas codificada por uma família de genes (Kliebenstein *et al.*, 1998). Trabalhos realizados por Camp *et al.* (1997) demonstraram a presença destes três tipos de SOD em tabaco. Experimentalmente, estas três classes de SOD podem ser distinguidas pois apresentam diferentes sensibilidades a algumas substâncias. A isoforma Cu/ZnSOD é sensível ao cianeto e ao H_2O_2 , enquanto que a isoforma FeSOD apenas é sensível ao H_2O_2 e a MnSOD é resistente a ambos os inibidores (Scandalios, 1993).

A origem evolutiva das diferentes classes de SOD ainda não se encontra totalmente esclarecida, no entanto, dados de sequenciação sugerem que as três classes de SOD pertencem a duas famílias filogenética, as Cu/ZnSODs e as Fe/MnSODs. As FeSOD e as MnSOD estão estritamente relacionadas uma vez que partilham um elevado nível de homologies quer estruturais quer de sequências aminoacídicas e, não estão relacionadas com as Cu/Zn SODs (Scandalios, 1993). As Cu/ZnSODs apresentam

sequências de aminoácidos altamente conservadas relativamente aos locais de ligação do metal (Scandalios, 1993). As FeSOD e as MnSOD são estruturalmente muito semelhantes e, em alguns casos, as enzimas funcionam com qualquer um dos metais no seu centro activo. Por sua vez as Cu/ZnSOD não estão estruturalmente relacionadas com as MnSOD (Scandalios, 1997).

A maior parte das plantas possui nos seus cloroplastos a FeSOD e a Cu/ZnSOD, no citosol possui a Cu/ZnSOD e nas mitocôndrias é comum encontrar a MnSOD. Outros estudos permitiram verificar também a presença desta enzima nos peroxissomas de algumas plantas (Del Rio, 1983; Bray *et al.*, 2000).

O número de isoenzimas, bem como a abundância relativa de cada tipo de SOD varia grandemente de planta para planta (Bowler *et al.*, 1992). A existência de múltiplas isoformas moleculares, de localizações distintas nos tecidos e organelos, bem como as alterações de expressão que as isoformas sofrem durante o desenvolvimento, implica que estas desempenhem papéis fisiológicos distintos (Scandalios, 1997). Em milho foram encontradas cinco isoformas em todos os tecidos da planta (Scandalios, 1997). Em folha de batateira observou-se a presença de quatro isoformas de SOD (Santos *et al.*, 1999).

A importância da SOD na defesa de plantas sujeitas a stresse tem recebido muita atenção, uma vez que se sabe que esta enzima é produzida durante várias condições adversas. Vários tipos de stresse podem afectar os níveis da SOD numa célula quer através do controlo da síntese quer do controlo da actividade desta enzima. Estes efeitos já foram evidenciados para vários tipos de stresses como frio, calor, salinidade, tratamento com herbicida, ataque de patogénios (Martinez *et al.*, 2001) e radiação UV-B (Santos *et al.*, 1999). Relativamente a muitos destes stresses o aumento de resistência das plantas, foi correlacionado com o aumento de actividade da SOD e de outras enzimas do sistema antioxidante (Scandalios, 1993). Aumentos da actividade da SOD foram observados, por exemplo, em resposta ao tratamento com certo tipo de herbicidas (Scandalios, 1993; Scandalios, 1997). Em milho, exposição da planta ao paraquato, levou ao aumento de actividade da Cu/Zn SOD do cloroplasto e do citosol (Matters & Scandalios, 1986). Ambientes com temperatura e luz elevados bem como situações de secura, falta de oxigénio, ataque de patogénio ou elevados níveis de ozono, também provocaram um aumento dos níveis da SOD (Scandalios, 1993).

Alguns estudos permitiram relacionar aumentos de actividade de determinado tipo de SOD com os locais mais afectados por determinado tipo de stresse. Por

exemplo, quando um stresse afectava predominantemente os cloroplastos, verificou-se um aumento da síntese e actividade da FeSOD. Por outro lado, quando um stresse afectava predominantemente as mitocôndrias, verificou-se um aumento da transcrição e actividade da MnSOD (Tsang *et al.*, 1991).

Estudos realizados com plantas transgénicas que sobreexpressavam a SOD demonstraram a importância desta enzima na tolerância ao stresse oxidativo (Camp *et al.*, 1997; Van Breusegem *et al.*, 1999). Por exemplo, plantas de tabaco transgénicas que sobreexpressavam a Cu/ZnSOD apresentaram maior resistência ao dano fotooxidativo e ao stresse oxidativo mediado pelo metilviologénio do que as plantas controlo (Gupta *et al.*, 1993). Em 1993, Perl e colaboradores demonstraram que batateiras transgénicas que sobreexpressavam a Cu/ZnSOD cloroplastideal ou citosólica eram mais resistentes ao paraquato. Em ervilheira, Allen (1995), verificou que a sobreexpressão da Cu/ZnSOD ou da MnSOD, tornava a planta de tabaco mais resistente ao dano provocado por exposição ao metilviologénio. Estudos realizados por Van Camp *et al.* (1996) demonstraram que plantas transgénicas que sobreexpressavam a FeSOD estavam melhor protegidas contra o stresse oxidativo do que plantas selvagens (mais referências em Alscher *et al.*, 1997) (Arisi *et al.*, 1998). Em Alfalfa, a introdução de cDNA de MnSOD, fez aumentar a tolerância desta espécie ao frio, a herbicidas entre outros stresses (McKersie *et al.*, 1993).

2.1.2- CATALASE

A catalase é uma enzima responsável pela remoção do H₂O₂ da célula. É uma enzima tetramérica que contém um grupo heme (Scandalios *et al.*, 1997). Quando na presença de elevadas concentrações de H₂O₂ converte esta molécula em água e oxigénio molecular, através de uma reacção catalítica na qual o H₂O₂ actua quer como aceitador quer como dador de hidrogénio (fig. 15) (Scandalios *et al.*, 1997).



Fig. 15- Reacção catalisada pela CAT, para elevadas concentrações de H₂O₂.

Quando as concentrações de H₂O₂ são baixas, a CAT pode actuar como peroxidase, onde uma grande variedade de dadores de hidrogénio (etanol, ácido ascórbico) podem ser oxidados (fig. 16) (Scandalios *et al.*, 1997).



Fig. 16- Reacção catalisada pela CAT, para baixas concentrações de H_2O_2

Apesar desta enzima apresentar uma taxa catalítica muito grande, possui baixa afinidade para o substrato, uma vez que a reacção requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 ao centro activo da enzima (Noctor & Foyer, 1998). Assim, as elevadas concentrações de enzima são um pré-requisito necessário para as concentrações de H_2O_2 diminuírem (Asada, 1997). Trabalhos realizados por Rojas-Beltran *et al.* (2000) demonstraram que esta enzima não funcionava até que as concentrações de H_2O_2 atingissem determinado nível. A actividade da enzima aumentava linearmente com o aumento de concentração de H_2O_2 uma vez que a enzima não é facilmente saturada e, assim sendo, mantém controlada a concentração intracelular de H_2O_2 (Scandalios *et al.*, 1997).

A CAT apresenta múltiplas formas enzimáticas já demonstradas para várias espécies de plantas como *Arabidopsis*, tabaco e *Nicotiana plumbaginifolia*. Nestas plantas foi demonstrada a presença de três classes de catalases geneticamente distintas (Willekens *et al.*, 1994; Scandalios *et al.*, 1997), denominadas de CAT-1, CAT-2 e CAT-3 (Scandalios, 1997). Em *Solanum tuberosum* já foram isolados e caracterizados dois cDNAs de CAT: a *Cat1* (Wu & Shah, 1995) e a *Cat2* (Niebet *et al.*, unpublished). Na variedade *desirée* de *S. tuberosum*, já se obtiveram neste laboratório dois cDNA, um completo para CAT-1 e um parcial para CAT-2.

Nas plantas, a presença de múltiplas isoenzimas de CAT em diferentes tecidos, em diferentes fases de desenvolvimento e em diferentes condições de crescimento, sugere múltiplos papéis fisiológicos para estas isoenzimas (Scandalios *et al.*, 1997).

Estudos realizados em algumas plantas demonstraram que alguns dos genes que codificam algumas classes de CAT, parecem ser reguladas a nível da transcrição por um relógio circadiano (Scandalios *et al.*, 1997).

Estudos realizados em milho permitiram verificar que cada um dos genes da CAT (por exemplo *cat 3* de milho ou *cat 2* de *Arabidopsis*) exhibe especificidade de expressão temporal, espacial e respondem de maneira diferente a diferentes sinais ambientais. Para além disso, verificou-se que as isoenzimas da catalase exibiam especificidade celular a nível dos organelos (referências em Scandalios *et al.*, 1997).

Embora bioquimicamente distintas, os três tipos de CAT são capazes de interagir *in vitro* formando heterotetrâmeros (Scandalios, 1979). A CAT-1 e CAT-2 também formam estes heterotetrâmeros quando expressas *in vivo* (Scandalios *et al.*, 1997). A CAT-3 *in vivo* apenas foi encontrada sob forma de monotetrâmero mesmo quando a sua expressão temporal e local coincidia com CAT-1 e CAT-2 (Scandalios *et al.*, 1997).

Em folhas verdes de milho a CAT-2 foi localizada nos peroxissomas das células das nervuras, a CAT-1 e CAT-3 foram encontradas nas células do mesófilo (Tsaftaris *et al.*, 1983). Também em milho, as isoenzimas CAT-1 e CAT-2 mostraram estar presentes no citoplasma e/ou nos peroxissomas/glioxissomas. Em contraste, a CAT-3 surgiu exclusivamente nas mitocôndrias (Scandalios *et al.*, 1997).

Em dicotiledónea ainda não foram efectuados estudos tão aprofundados relativamente a esta enzima, no entanto, estudos realizados em *Nicotiana plumbaginifolia* demonstraram a presença dos três tipos de CAT. A CAT denominada de CAT-1 foi detectada em folhas mas também em flores e caules. Demonstrou estar sob controlo do ritmo circadiano e pareceu ter um papel importante na eliminação de H_2O_2 proveniente da fotorespiração. A CAT-2 foi encontrada preferencialmente nos tecidos vasculares e pensa-se ter um papel importante no processo de lenhificação. A CAT-3 verificou-se estar presente em vários tecidos como raiz, caule, folhas jovens e flores. Esta CAT parece ter papel importante na eliminação do H_2O_2 produzido nos glioxissomas (Willekens *et al.*, 1994).

A catalase é encontrada predominantemente nos peroxissomas (mas também nos glioxissomas) onde funciona essencialmente para remover o H_2O_2 formado durante a fotorespiração (ou β -oxidação dos ácidos gordos nos glioxissomas) (Bowler *et al.*, 1992). No citoplasma já foi confirmada a sua presença e a sua importância na remoção efectiva do H_2O_2 citosólico (Scandalios *et al.*, 1997). Não existe catalase associada aos cloroplastos (Scandalios *et al.*, 1997). Apesar desta localização restrita, esta enzima desempenha um papel significativo na defesa contra o stresse oxidativo uma vez que o H_2O_2 pode facilmente atravessar as membranas celulares (Bowler *et al.*, 1992).

As informações resultantes do conhecimento da distribuição das diferentes classes de CAT em diferentes compartimentos celulares e em diferentes plantas tem permitido estabelecer **relações evolutivas** entre as CATs de várias espécies de plantas e de outros organismos aeróbios (Guan & Scandalios, 1996). A comparação dos nucleótidos e sequência aminoacídica indicou que, as CATs das plantas podem ser divididas em três grupos (fig. 17).

O maior grupo de CATs (grupo I) inclui a CAT-1 de monocotiledónea (milho) e a maior parte das CATs de dicotiledóneas (fig. 17). O segundo grupo inclui a CAT-2 de *N. plumbaginifolia* e a CAT de tomateiro e o terceiro grupo inclui as a CAT-3 de monocotiledónea (milho) e a CAT-A de Arroz e CAT-2 de cevada (Scandalios *et al.*, 1997) (fig. 17). Dentro do grupo I, as CAT podem ser separadas em dois grandes grupos: as CATs de monocotiledóneas e as CATs de dicotiledóneas (Scandalios *et al.*, 1997). Estes resultados claramente indiciam que a maior parte da CAT de dicotiledóneas e de monocotiledóneas estão estritamente relacionadas umas com as outras (grupo I). As CATs específicas das monocotiledóneas (grupo III) também se encontram estritamente relacionadas, no entanto, apresentam sequências muito parecidas com outras CATs (Scandalios *et al.*, 1997).

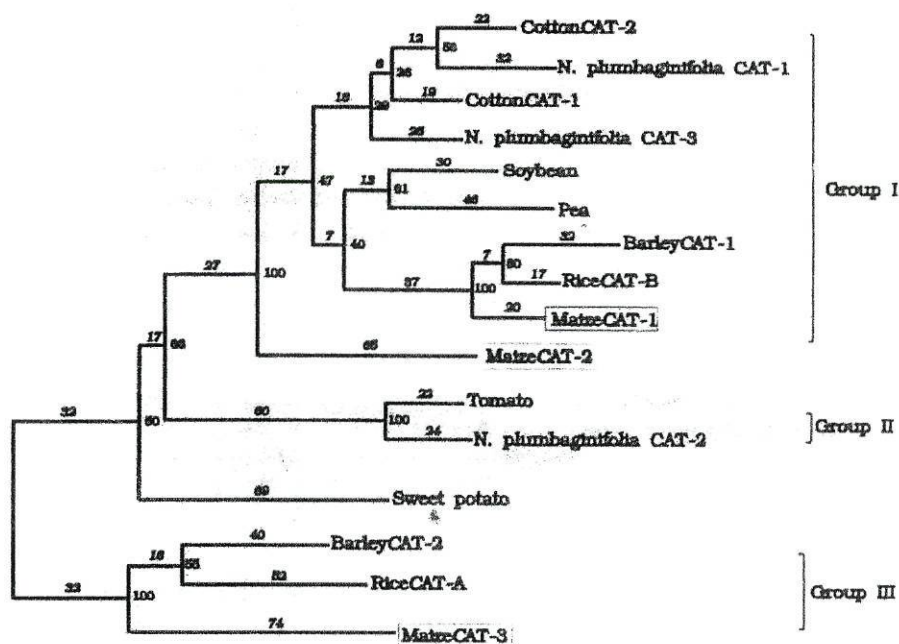


Fig 17 – Árvore filogenética das CATs baseada na sequência aminoacídica de dezasseis catalases de plantas. Esta árvore foi construída seguindo o método da parcimónia (retirado de Scandalios *et al.*, 1997).

A resposta da CAT ao stresse biótico e abiótico é muita variável de planta para planta e de stresse para stresse. Em células de tabaco a desenvolver a resposta de hipersensibilidade, os níveis de proteína e de mRNA da CAT-1 e CAT-2 diminuíram paralelamente à diminuição da sua actividade. Esta resposta ocorreu paralelamente a uma grande acumulação de H_2O_2 (Dorey *et al.*, 1998). Certos estudos apontam para o facto de, durante interacções incompatíveis com patogénios, o ácido salicílico inibir a actividade de CAT endógenas permitindo o aumento da concentração de H_2O_2 (Able *et*

al. 2000). Este H_2O_2 parece ter um papel importante para iniciar um conjunto de mecanismos de defesa das plantas (Chen *et al.*, 1993). Em folhas de milho, a inoculação com o fungo *Cercospora* levou a um aumento de cerca de 25% na actividade total da CAT embora as diferentes isoenzimas se tenham comportado de forma diferente. Verificou-se uma diminuição da actividade da CAT-2 mas um aumento de actividade da CAT-3 (Scandalios *et al.*, 1997). Em dicotiledóneas como *Nicotiana plumbaginifolia*, o tratamento de folhas com radiação UV-B levou a uma diminuição de transcritos de *Cat 1* mas a um aumento de transcritos dos genes *Cat 2* e *Cat 3*. Comportamento idêntico foi demonstrado quando as folhas foram sujeitas a níveis elevados de O_3 (Willekens *et al.*, 1994).

Além dos factores bióticos e abióticos referidos, a expressão dos genes da CAT também é influenciada por outros factores como, por exemplo, fase de desenvolvimento da planta, tipo de tecido, presença de determinadas hormonas, entre outros (Scandalios *et al.*, 1997).

As CAT e as SOD são enzimas anti-oxidantes muito eficientes. A sua acção combinada permite converter o perigoso radical superóxido em peróxido de hidrogénio e posteriormente em água e oxigénio molecular, evitando assim o dano celular (fig. 18) (Scandalios, 1993). A acção combinada destas duas enzimas reduz também a formação de uma das EROs mais tóxicas e reactivas, o radical hidroxilo (Scandalios, 1993; Scandalios, 1997).

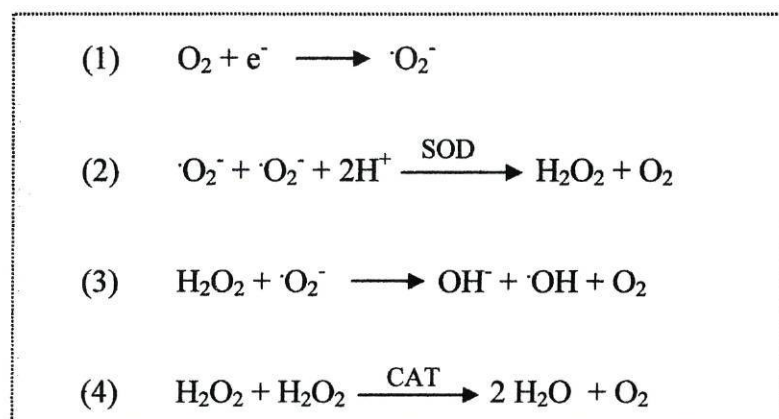


Fig. 18- Acção combinada da SOD e da CAT na remoção das EROs.

2.1.3- PEROXIDASES

As peroxidases são enzimas ubíquas encontradas em todas as plantas verdes, muitos fungos e bactérias aeróbias. Estas enzimas convertem o H_2O_2 em H_2O , no entanto, ao contrário das CAT requerem um substrato (R) para catálise (fig. 19). Nesta reacção, o oxigénio não está envolvido, no entanto, alguns aceitadores são oxidados, nomeadamente compostos fenólicos, nitratos, citocromo C entre outros (Siegel, 1993). Ao contrário das CATs estas enzimas são efectivas mesmo para baixas concentrações de H_2O_2 .

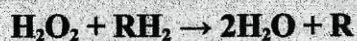


Fig. 19 – Reacção catalisada pelas peroxidases.

Existe um grande número de isoenzimas de peroxidases sendo comum encontrar mais de trinta peroxidases numa única variedade de plantas dependendo do tecido ou estado de desenvolvimento (Siegel, 1993).

2.1.3.1- Peroxidases do ascorbato- APX

A importância destas enzimas na resposta ao stresse oxidativo advém-lhe do facto de ter a capacidade de remover o H_2O_2 das células. Estas enzimas apresentam uma afinidade para o substrato muito maior do que a catalase, no entanto, requerem a presença de uma molécula redutora que, nas plantas, geralmente é o ascorbato (AA) (Noctor & Foyer, 1998). Esta enzima utiliza duas moléculas de ascorbato para reduzir o H_2O_2 a água, com a produção de duas moléculas de monodesidroascorbato (MDHA) e água (fig. 20) (Mittler & Zilinskas, 1993).

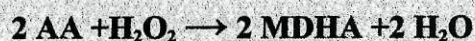


Fig. 20- Reacção catalisada pela Peroxidase do Ascorbato.

O MDHA pode ser posteriormente reduzido directamente a ascorbato sendo o dador de electrões para a sua redução o citocromo, a ferredoxina reduzida ou o NAD(P)H (Noctor & Foyer, 1998). A reacção é catalisada por MDHA reductases. O

MDHA pode também ser convertido em desidroascorbato (DHA) que é reduzido a ascorbato pela acção de DHA reductase, usando como substrato redutor a glutatona (GSH). Esta reacção gera glutatona oxidada (GSSG) que por sua vez tem de ser novamente reduzida a GSH utilizando o poder redutor do NADPH, numa reacção catalisada pela glutatona reductase (GR) (fig. 21) (Noctor & Foyer, 1998). A remoção de H_2O_2 através deste conjunto de reacções que envolve a APX, a glutatona reductase, a desidroascorbato reductase e a monodesidroascorbato reductase é conhecido como o **ciclo ascorbato – glutatona** (fig. 21).

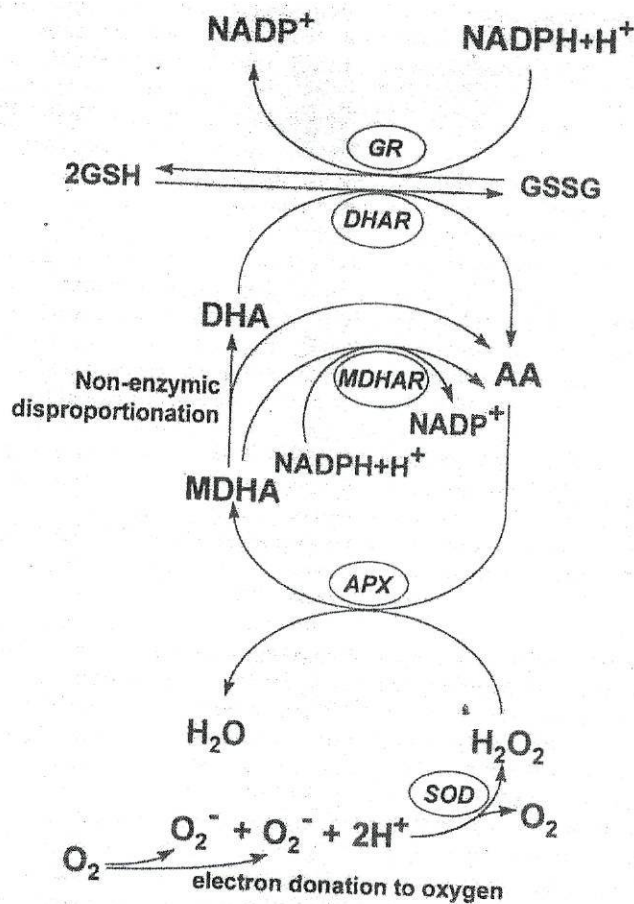


Fig. 21- Ciclo ascorbato-glutationa envolvido na remoção do peróxido de hidrogénio em diferentes compartimentos celulares (retirado de Noctor & Foyer, 1998).

Quando a concentração de ascorbato é baixa (menor que $20 \mu M$) a enzima APX é inactivada. Estudos realizados em mutantes de *Arabidopsis* deficientes na síntese do ascorbato mostraram uma diminuição de actividade da APX e uma maior sensibilidade a condições de stresse (Conklin *et al.*, 1997). Assim, no sentido de manter a actividade da APX, é essencial adicionar ascorbato durante os procedimentos experimentais

(extracção, purificação, armazenamento), uma vez que esta molécula é essencial para a actividade desta enzima (Asada, 1997; Shigeoka *et al.*, 2002). A APX é inibida pela azida ou cianida como outras proteínas heme. Um dos inibidores mais característicos é o p- cloromercuribenzoato (P- CMB) (Asada, 1992). Dado que este inibidor não afecta as peroxidases do guaiacol poderá ser uma ferramenta útil para diferenciar as peroxidases do ascorbato das peroxidase do guaiacol (Amako *et al.*, 1994).

Nas plantas superiores existem, pelo menos, quatro isoformas de APX designadas com base na sua localização subcelular, que pode ocorrer nos tilacoides (tAPX), no estroma (eAPX), no citoplasma (cAPX) ou na membrana dos glioxissomas (mgAPX) (Bunkelmann & Trelease, 1996). Uma quinta isoforma de APX foi encontrada na membrana das mitocôndrias e denominada de APX mitocondrial (mit APX) (Jiménez *et al.*, 1997).

As várias isoformas da APX variam na especificidade do substrato, no pH óptimo de actuação, na massa molecular entre outras características (Bunkelmann & Trelease, 1996). As APX cloroplastideais são isoenzimas que existem no estroma (eAPX) e/ou na membrana dos tilacoides dos cloroplastos (tAPX). São muito específicas do ascorbato como dador de electrões, e são extremamente sensíveis na sua ausência e na presença de inibidores (Asada, 1997). As APX citosólicas são mais estáveis e não são tão específicas relativamente ao dador de electrões, uma vez que podem oxidar fenóis (Bunkelmann & Trelease, 1996). As APX da membrana do glioxissoma protegem a sua membrana uma vez que eliminam o H_2O_2 gerado na matriz deste organelo. Durante a germinação, os lípidos armazenados são convertidos em hidratos de carbono através de duas vias: a β -oxidação dos ácidos gordos ou o ciclo do glioxilato (Bunkelmann & Trelease, 1996). O H_2O_2 é gerado pela acetil-CoA oxidase e NADH oxidase ou é formado enzimaticamente pela actuação da SOD sobre o ião superóxido (fig. 22) (Bunkelmann & Trelease, 1996). Embora a CAT da matriz degrade a maior parte do H_2O_2 , a sua afinidade para esta molécula é relativamente baixa. Assim, quando o H_2O_2 se encontra em baixas concentrações é a gmAPX que elimina mais eficientemente o H_2O_2 (fig. 22). A eliminação do H_2O_2 pela APX do glioxissoma requer a continua regeneração do ascorbato pelo ciclo do ascorbato-glutationa (Bunkelmann & Trelease, 1996).

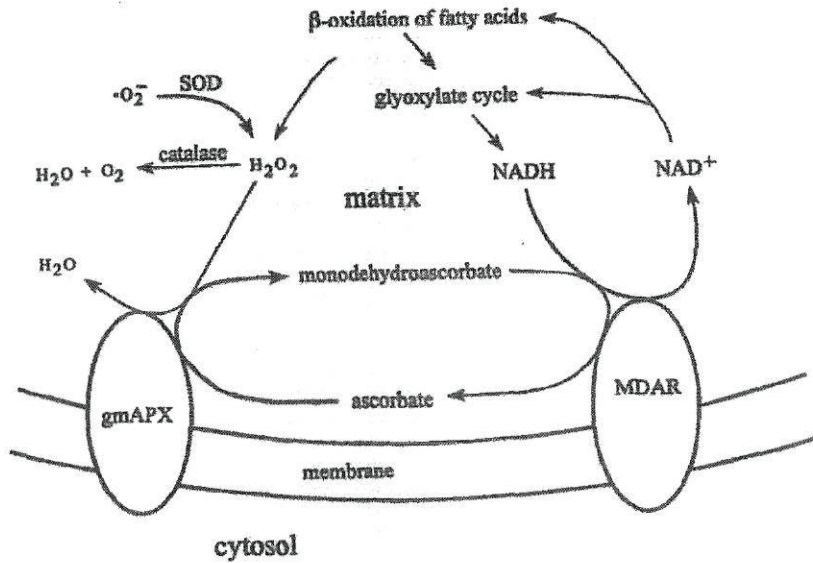


Fig. 22- Modelo ilustrativo da remoção de H_2O_2 nos glioxissomas de sementes oleosas. A catalase e a gmAPX eliminam o H_2O_2 produzido pelas reacções catalisadas pela SOD e pela β -oxidação de ácidos gordos. O ascorbato é regenerado pelo ciclo ascorbato-glutationa (retirado de Bunkelmann & Trelease, 1996).

Com base na sequência aminoacídica da região catalítica das isoenzimas de APX foi possível a construção de uma árvore filogenética (fig. 23). Esta árvore mostra que as isoenzimas de APX de plantas superiores e algas podem ser divididas em quatro grupos: as APX citosólicas I, as APX citosólicas II, as APX cloroplastideais e as APX da membrana dos glioxissomas/peroxissomas. Segundo Shigeoka e colaboradores (2002) nas plantas superiores as isoenzimas de APX apresentaram homologias na ordem dos 70 a 90 % dentro de cada grupo. Entre os quatro grupos de isoenzimas o grau de homologia situou-se entre os 50 a 70 %.



Fig. 23 – Árvore filogenética das isoenzimas de APX. cAPX I- APX citosólicas I; cAPX II - APX citosólicas II; chl APX- APX cloroplasteais; mAPX - APX da membrana dos glioxissomas/peroxissomas (retirado de Shigeoka *et al.*, 2002).

Muitas características internas da planta bem como diversas condições ambientais (luz, sal, temperatura, secura, infecções, e outros) podem afectar as peroxidases quer quantitativamente quer qualitativamente. Em folhas de espinafre sujeitas a luz intensa ou a tratamentos com metilviologénio, verificou-se que os níveis de transcritos para a APX, aumentaram de forma notória, tendo estes aumentos sido mediados por um aumento de H_2O_2 (Yoshimura *et al.*, 2000). Estudos realizados em milho resistente à secura, demonstraram que nestas plantas ocorria uma grande indução da actividade das APX quando comparadas com plantas sensíveis (Pastori & Trippi, 1992). Em plantas de tabaco infectadas pelo vírus do mosaico do tabaco, foi demonstrado que os níveis de transcritos que codificam a APX citosólica foram induzidos durante a resposta de hipersensibilidade (Mittler *et al.*, 1999). Outros estudos realizados em plantas de tabaco transgénicas que sobreexpressavam as APX citosólica,

mostraram que as plantas ficaram mais tolerantes ao dano provocado pelo metilviologénio (Pitcher *et al.*, 1994). Por outro lado, plantas transgênicas que expressavam o RNA *anti-sense* da cAPX, apresentaram uma diminuição de actividade em cerca de 50% (Övar & Ellis, 1997). No entanto, outros estudos indicaram que alguns stresses diminuía e não aumentavam a actividade da APX. Por exemplo, após indução vírica em plantas ocorria morte celular do tipo RH que foi acompanhada pela supressão da APX citosólica. Esta supressão provavelmente contribuirá para acumulação de H₂O₂ e a activação deste programa de morte celular em resposta à infecção (Vranová *et al.*, 2002).

2.1.3.2- Peroxidases de guaiacol- GPX

Este tipo de peroxidases participam num grande número de processos fisiológicos como a biossíntese de lenhina e do etileno, degradação de indole-3-acetato, estabelecimento de ligações cruzadas entre glicoproteínas ricas em prolina, defesa contra patogénios, entre outros (Asada, 1997). Esta enzima parece também estar envolvida no processo de reparação de fosfolípidos que sofreram peroxidação (Schuckelt *et al.*, 1991), sendo aparentemente a única proteína identificada como estando envolvida nesta reparação (Willekens *et al.*, 1994).

Estas enzimas também pertencem ao sistema antioxidante da célula uma vez que têm a capacidade de remover o H₂O₂ das células. Muitas isoformas da GPX foram encontradas em vários locais da célula como vacúolos, parede celular, citosol e apoplasto (Asada, 1997). As peroxidases do guaiacol são pouco específicas no que diz respeito ao dador de electrões, no entanto, preferem fenóis aromáticos como guaiacol ou pirogalol (Amako *et al.*, 1994; Asada, 1997).

Em organelos como cloroplastos, peroxissomas e mitocôndrias pouca actividade desta enzima foi detectada (Asada, 1997). A expressão das isoformas específicas varia com o desenvolvimento, senescência, os ferimentos ou o ataque de patogénios (referências em Amako *et al.* 1994).

Em dicotiledóneas como *N. plumbaginifolia*, o tratamento de folhas com radiação UV-B ou com O₃ levou a um aumento dos níveis de mRNA de GPX (Willekens *et al.*, 1994). Em tubérculos de batateira, a presença desta enzima foi detectada em todas as fases de desenvolvimento estudadas por Rojas e colaboradores (2000).

A tabela 3 resume algumas das diferentes defesas enzimáticas da planta, local onde actuam, tipo de EROs em que actuam, bem como os produtos resultantes dessa actuação.

Tabela 3- Resumo dos sistemas enzimáticos antioxidantes em plantas superiores (adaptado de Scandalios, 1993).

Localização subcelular	Tipo de ERO's	Origem das ERO's	Sistemas enz. de desintoxicação	Produtos resultantes
Cloroplastos	O_2^- H_2O_2	PSII Enzimaticamente	SOD APX	H_2O_2 desidroascorbato GSH-glutationa NADP+
Mitocôndria	O_2^- H_2O_2	Transporte de electrões Enzimaticamente	SOD APX CAT	H_2O_2 H_2O +dador oxidado $H_2O + O_2$
Citosol	O_2^- H_2O_2	Enzimaticamente Enzimaticamente	SOD CAT APX	H_2O_2 $H_2O + O_2$ H_2O + dador oxidado
Glioxissomas Peroxisomas	H_2O_2 H_2O_2	β - oxidação Fotorespiração	CAT CAT	$H_2O + O_2$ $H_2O + O_2$
Extracelular	O_2^- H_2O_2	Enzimaticamente Enzimaticamente	Não conhecido peroxidase	Não conhecido Lenhina, suberina, hidroxiprolina

Estudos recentes realizados por Rizhsky e colaboradores (2002) em plantas de tabaco transgênicas demonstraram que, após o silenciamento do mRNA para a CAT ocorria a indução da actividade de outras enzimas antioxidantes como a APX e a GPX e que após o silenciamento da APX se verificava um aumento de actividade da CAT, da SOD e da GR. Estes resultados sugerem um elevado grau de redundância nos mecanismos de desintoxicação das EROs. No entanto, o mais surpreendente foi verificar que plantas que apresentavam um bloqueio simultâneo destas duas enzimas apresentavam uma maior resistência ao stresse oxidativo do que as plantas em que apenas se tinham inibido a expressão da CAT ou da APX. Estes resultados indicaram que as plantas teriam desenvolvido mecanismos alternativos que compensavam a falta destas duas enzimas. Esses mecanismos, de acordo com os estudos realizados pelos autores, envolviam por um lado a diminuição da produção de EROs, através da

supressão da actividade fotossintética e, por outro, a activação outros mecanismos para eliminar o H_2O_2 como a indução da enzima MDHA reductase e a via pentose fosfato (Rizhsky *et al.*, 2002).

2.2- Sistemas anti-oxidantes não enzimáticas

Para além das enzimas, existem pequenas moléculas capazes de neutralizar, remover ou transformar as EROs em moléculas menos reactivas. Estas moléculas podem estar presentes em fase aquosa e/ou nas membranas celulares (tabela 4).

Tabela 4 – Exemplos de algumas moléculas antioxidantes presentes nas plantas em fase aquosa e nas membranas celulares (adaptado de Bartosz, 1997).

Presentes em fase aquosa	Presentes nas membranas celulares
Ascorbato	Carotenos
Flavonoides	Tocoferois
Glutationa	Xantofilas
Polifenóis	Vitamina D

Algumas das moléculas mais importantes deste sistema são o ascorbato, a glutathione, o tocoferol e os carotenoides, que estão presentes em vários compartimentos celulares.

Nas plantas, o **ascorbato** pode ser acumulado em concentrações na ordem dos milimolar quer em tecidos fotossintéticos quer em tecidos não fotossintéticos. O ascorbato encontra-se em vários compartimentos celulares como vacúolo, citosol, cloroplasto, apoplasto. Esta molécula desempenha algumas funções importantes na célula, nomeadamente, é um dos principais antioxidantes primários, podendo reagir directamente e rapidamente com radicais hidroxilo, superóxido, peróxido de hidrogénio e singlete de oxigénio, participando desta forma para a remoção destas EROs (Noctor & Foyer, 1998). Para além disso, é importante na fotoprotecção e na regulação da fotossíntese, onde tem um importante papel na preservação da actividade das enzimas que contêm iões metálicos de transição (Noctor & Foyer, 1998). O ascorbato é também um poderoso antioxidante secundário, uma vez que reduz a forma oxidada do α -tocoferol (Noctor & Foyer, 1998).

A **glutationa** é uma molécula que existe nos vacúolos, citosol, nas mitocôndrias, e nos cloroplastos, sendo o principal composto solúvel da célula com o grupo -SH. A forma reduzida da glutathione (GSH) é um tripeptídeo que se pode modificar para uma forma oxidada, por oxidação do grupo -SH e formar glutathione dissulfureto (GSSG) (Noctor & Foyer, 1998). A forma oxidada da glutathione pode ser convertida novamente na sua forma reduzida pela actividade da enzima glutathione reductase (fig. 21) (Foyer & Halliwell, 1976). Nas plantas, o significado funcional da glutathione pode ser dividido em duas categorias: metabolismo do enxofre e defesa. Relativamente a esta segunda categoria a GSH funciona como antioxidante (Noctor & Foyer, 1998), reduzindo directamente o $\cdot O_2^-$, no entanto, esta função é pouco importante uma vez que a sua concentração dos cloroplastos é mais baixa do que a do ascorbato (Polle, 1997). Esta molécula também protege as enzimas que contêm grupos SH da oxidação inespecífica. Algumas dessas enzimas são as ATPases da membrana e algumas enzimas do ciclo de Calvin. Para além desta função, desempenha um papel importante como agente redutor do desidroascorbato no ciclo do ascorbato-glutathione (Polle, 1997).

Os **carotenoides** são os mais eficientes antioxidantes na remoção do singlete de oxigénio quando comparados com as outras moléculas antioxidantes. Os carotenoides, presentes nas membranas dos tilacoides, podem interactuar com os estados excitados da clorofila, nomeadamente com o estado de tripleto, impedindo a cedência de energia para o oxigénio molecular, e assim, impedindo a formação de singlete de oxigénio (Polle, 1997). O PS II contém β -caroteno que protege o centro de reacção dos danos provocados por excesso de luz (Foyer, 1997).

O **α -tocoferol** é uma molécula lipofílica que se encontra nas membranas celulares, particularmente nas membranas dos tilacoides (Polle, 1997). Funciona como molécula antioxidante pois elimina o radical superóxido, o singlete de oxigénio e o radical hidroxilo e evita a peroxidação dos lípidos da membrana (Niki *et al.*, 1984). Esta molécula, tal como a glutathione, protege integralmente as proteínas da membrana da oxidação inespecífica dos grupos SH (Polle, 1997).

Deve ser lembrado que as enzimas ou moléculas antioxidantes apenas actuam nas EROs menos agressivas (H_2O_2 e O_2^-) e não nas mais perigosas como o $\cdot OH$. Aparentemente a estratégia da natureza ao longo da evolução foi a prevenção da formação de $\cdot OH$, por exemplo através da decomposição de precursores de $\cdot OH$ ou através da sequestração de metais de transição, como o Ferro que pode ser armazenado

sob forma de ferritina, de forma a limitar a sua participação na reacção de Fenton (Bartozs, 1997; Fourcroy, 1999). A figura 24 relaciona alguns dos mecanismos de produção e de eliminação de EROs nas células vegetais, evidenciando a organização e cooperação de toda a rede de defesas da planta que vai determinar a competência do sistema antioxidante da célula.

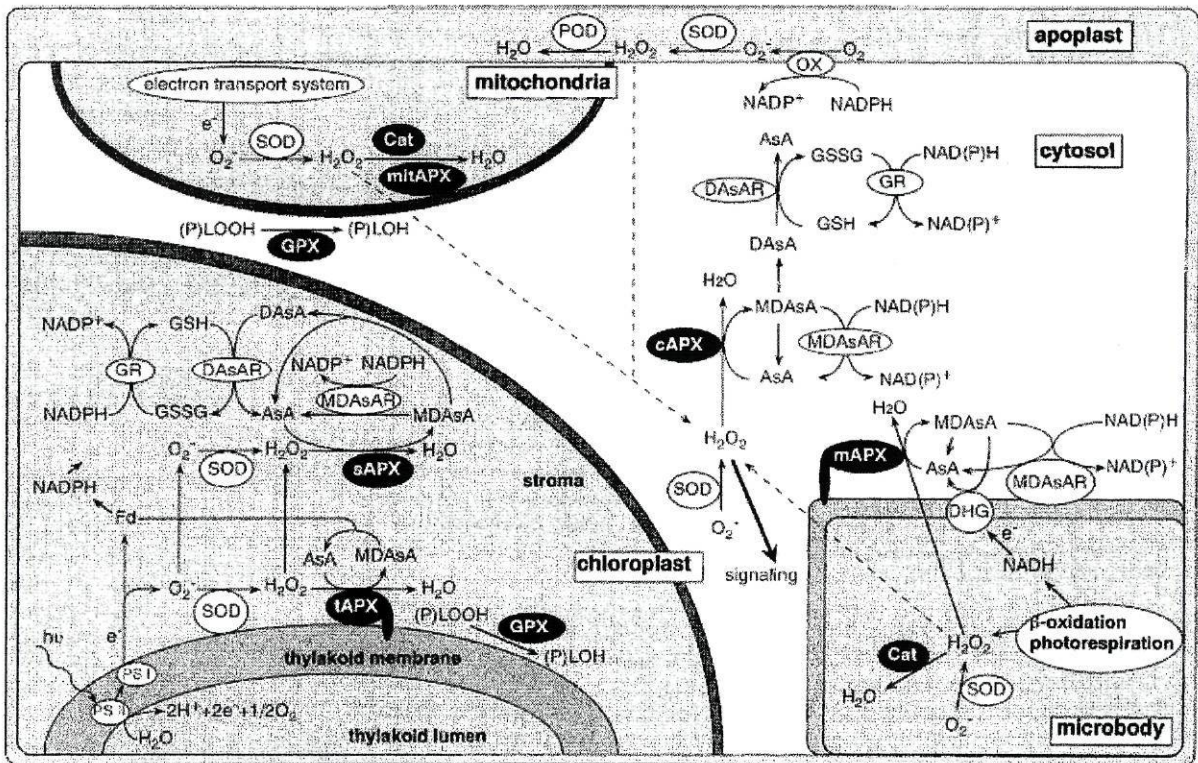


Fig. 24 - Diferentes vias de produção de EROS e sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (retirado de Shigeoka *et al.*, 2002).

3- Consequências do disparo oxidativo

Em circunstâncias normais, as células são capazes de equilibrar a produção de oxidantes e antioxidantes de forma a haver um equilíbrio. No entanto, o stresse oxidativo pode surgir quando ocorre um aumento de produção de EROs, sem um correspondente aumento da produção de antioxidantes, ou quando ocorre uma diminuição das defesas antioxidantes de uma célula (fig. 25).

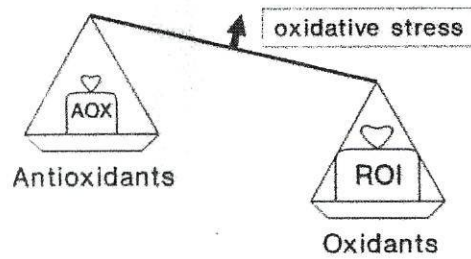


Fig. 25- Esquema representativo do desequilíbrio entre a quantidade de EROs e de defesas antioxidantes que ocorrem durante o stresse oxidativo (adaptado de Funchs *et al.* 1997).

Nas plantas, as consequências do disparo oxidativo, podem ser visíveis a nível externo, manifestando-se muitas vezes sob forma de clorose foliar ou mesmo perda de folhas, no entanto, estas alterações são reflexos das alterações que ocorrem a nível celular, uma vez que as EROs podem afectar um grande número de processos fisiológicos. Os elevados níveis de EROs são responsáveis pela indução de alguns processos que causam danos nas células, podendo mesmo levar à sua morte. No entanto, estas mesmas EROs parecem ter um papel fundamental no estabelecimento de alguns mecanismos de defesa da célula. É a sua quantidade na célula, que vai determinar o tipo de resposta. Se elevadas concentrações podem provocar danos celulares e mesmo conduzir à morte celular, baixas concentrações podem induzir defesas e respostas adaptativas (fig. 26) (Vranová *et al.*, 2002). Assim, às EROs são reconhecidos pelo menos um dos seguintes papéis: são eliciadores e propagadores do dano oxidativo ou funcionam como moléculas sinal em vários processos de reparação.



Fig. 26- Possíveis consequências do aumento dos níveis de EROs nas células.

Uma das consequências do aumento dos níveis de EROs nas células é a **peroxidação lipídica**. A peroxidação lipídica é um processo que consiste na destruição gradual da integridade das membranas celulares, o que acarreta a perda de compartimentação dos organelos citoplasmáticos e conduz a um aumento da

permeabilidade da membrana plasmática e a uma menor fluidez da membrana (Kumar & Knowles, 1993). A peroxidação dos lípidos do plasmalema, leva à perda de conteúdo celular, à rápida dissecação podendo mesmo causar a morte celular. Os danos nas membranas intracelulares podem afectar a actividade respiratória da mitocôndria, provocar danos nos pigmentos e levar a uma diminuição da fixação do carbono nos cloroplastos (Scandalios, 1997).

Durante a peroxidação, os lípidos da membrana como o ácido linoleico e linolénico sofrem alterações, pela actuação da enzima Lipoxigenase (LOX) (Ohta *et al.*, 1991; Kolomiets *et al.*, 2000). A actividade desta enzima é induzida em várias situações nomeadamente após ataque de patogénios. Um aumento de actividade de LOX em resposta a infecções tem sido relacionado com o aumento de resistência da planta aos patogénios (Kolomiets *et al.*, 2000). Em batateira, durante uma interacção incompatível com o patogénio *Phytophthora infestans*, já foi demonstrada a indução de uma LOX específica denominada de POTLX-3 (Kolomiets *et al.*, 2000), e a indução de uma 9-lipoxigenase que é uma enzima dependente do metabolismo ácidos gordos polinsaturados (Gobel *et al.*, 2002). Também em arroz, a actividade da enzima LOX aumentou nas folhas quando infectadas com uma raça de fungo incompatível com a planta (Ohta *et al.*, 1991). Estas enzimas, para além de contribuir para a morte celular também parecem estar associadas à produção de substâncias antimicrobianas (Kolomiets *et al.*, 2000), e à activação da Resposta de Hipersensibilidade através dos produtos resultantes das suas reacções enzimáticas que talvez funcionem como moléculas sinal na activação deste processo (Greenberg, 1997).

Defeitos na via das lipoxigenases levaram a alterações de resposta de plantas ao ataque de patogénios, o que confirmou o papel directo ou indirecto destas enzimas no estabelecimento da resistência (Gobel *et al.*, 2002). O processo de peroxidação, é potenciado pela presença de EROs, onde ácidos gordos insaturados se tornam cada vez mais oxidados e assim, vão sendo removidos da bicamada lipídica. O H_2O_2 tem sido proposto como molécula responsável pela activação de lipoxigenases e, assim sendo, a peroxidação lipídica pode ser uma forma indirecta de quantificar a presença de EROs celulares (Bartozs, 1997).

Outra das consequências do aumento dos níveis de EROs na célula é a morte do patogénio. As EROs, por exemplo o H_2O_2 , se em elevadas concentrações, pode ter uma **actividade antimicrobiana** podendo mesmo levar à morte de um patogénio que ataque as plantas. Experiências realizadas demonstraram que o H_2O_2 tem a capacidade de inibir

a germinação de esporos de muitos patógenos (Lamb & Dixon, 1997). Por outro lado, as EROs têm também a capacidade de desencadear a **produção de substâncias antimicrobiais**. Aproximadamente vinte classes de proteínas anti-microbiais são conhecidas diferindo na sua estrutura e modo de acção. Estas classes incluem quer espécies induzidas, quer espécies pré-formadas (Collinge *et al.*, 2001). Estes compostos, podem estar presentes nas suas formas activas ou armazenados sob a forma de precursores inactivos que são convertidos nas suas formas activas, por exemplo, em resposta ao ataque de patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 2000). As EROs activam a síntese de muitos destes compostos com actividade antimicrobial como as fitoalexinas (Heil & Bostock, 2002). As saponinas e os glicosinolatos são outros dois compostos com actividade antimicrobial (Hammond- Kosack & Jones, 2000). Estudos realizados por Collinge e colaboradores (2001), permitiram verificar que em plantas sujeitas ao stresse causado por patógenos, a acumulação das fitoalexinas era muito mais rápida nas interacções incompatíveis do que nas compatíveis. Estudos realizados demonstraram que a aplicação directa de H_2O_2 ou de $\cdot O_2^-$ em fatias de tubérculo de batateira, era suficiente para levar à indução da produção de fitoalexinas (Chai & Doke, 1987). No entanto, outros estudos, nomeadamente os realizados em soja, demonstraram que proteínas fúngicas também estimulam a síntese de fitoalexinas mas sem ocorrer um disparo oxidativo (Davis *et al.*, 1993). Assim sendo, as EROs parecem não ter um papel essencial na activação ou na biossíntese das fitoalexinas, embora sejam um dos estímulos que a desencadeia (Alvarez & Lamb, 1997).

A grande diversidade destes compostos torna-os uma opção atractiva na tentativa de aumentar a resistência a patógenos usando a produção destes compostos em plantas transgénicas (Collinge *et al.*, 2001).

Outra das possíveis consequências do aumento dos níveis de EROs nas células é o **reforço das paredes celulares**. A parede celular é uma máquina molecular dinâmica constituída por uma estrutura complexa de polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas estruturais (Grant & Loake, 2000). Mudanças de propriedades da parede celular durante o desenvolvimento ou em resposta ao stresse requerem ou a síntese de novos compostos ou a modificação dos componentes celulares (Bradley *et al.*, 1992). Em resposta a situações de stresse, nomeadamente o ataque por patógenos, uma das estratégias de defesa mais rápidas que se verifica é o estabelecimento da ligação cruzada dos componentes da parede celular como proteínas, e polissacarídeos (Otte &

Wolfgang, 1996; Grant & Loake, 2000). A presença de EROs estimula este reforço, pois induz a produção da calose e lenhina (Hammond- Kosack & Jones, 2000). Esta maior consistência da parede celular poderá, por exemplo, atrasar a entrada de um patogénio até as defesas dependentes de transcrição serem activadas (Bradley *et al.*, 1992). Pensa-se que a acumulação extracelular de H_2O_2 após o disparo oxidativo, é um dos mecanismos responsáveis por este maior reforço da parede celular, que assim aumenta a resistência da barreira física contra patogénios (Grant & Loake, 2000). Experiências realizadas por Blokhina *et al.* (1999) e por Otte & Wolfgang (1996), confirmaram o envolvimento do H_2O_2 na formação da parede secundária em células vegetais.

Uma outra consequência do disparo oxidativo nas células é a **activação de diversos genes** envolvidos na resposta da planta a vários stresses. Um aumento de EROs está, por exemplo, envolvido na activação de um conjunto de genes relacionados com a defesa com patogénios, como os envolvidos como a produção de fitoalexinas e proteínas PR (*pathogenesis related*) como glucanases e quitinases (Heil & Bostock, 2002). Sabe-se que a secura induz um enorme leque de genes como gene *Lea* (*late embryogenesis abundant*) que codificam proteínas que aumentam a resistência à secura entre outros genes (Shinozaki *et al.*, 1999). Para além da secura e ataque de patogénios, muitos outros stresses activam genes de defesa. Por exemplo, o stresse causado por temperaturas elevadas leva à expressão de genes para a formação de proteínas de choque térmico (*HSPs- heat shock proteins*) e o stresse pelo frio leva à expressão de genes *COR* (*cold regulated*)(Bray *et al.*, 2000).

Outra das consequências do aumento de produção de EROs nas células é a activação ou inactivação de algumas proteínas que são sensíveis ao estado *redox* das células e que assim têm a capacidade de sofrer oxidações e reduções de forma reversível podendo ligar e desligar de acordo como o estado de *redox* da célula. As EROs têm a capacidade de ou oxidar directamente as proteínas sensíveis, ou oxidar indirectamente, através de moléculas sensíveis ao estado *redox* da célula como a GSH ou tioredoxinas (Arrigo, 1999). Estudos realizados permitiram verificar que a actividade de muitas enzimas, por exemplo do ciclo de Calvin, se encontram sob controlo do estado *redox* da célula (Vranová *et al.*, 2002). Para além disso, muitas cinases e fosfatases têm sido identificadas como sendo importantes na percepção e transdução de respostas de defesa

de plantas a patogénios (Doke, 1997; Xing *et al.*, 2002). A fosforilação de proteínas pode, por exemplo, alterar a sua actividade biológica, localização subcelular e tempo de vida. Já foram identificadas algumas proteínas cinase envolvidas na interacção planta-patogénio, nomeadamente a proteína cinase C cuja actividade parece mediar a interacção entre a batateira e *Phytophthora infestans* (Xing *et al.*, 2002).

A actividade de muitas enzimas que contêm metais como Fe^{3+} e Cu^{2+} , é muitas vezes afectada pela presença do radical superóxido que, dada a sua carga, não tem a capacidade de atravessar as membranas biológicas acumulando-se no local onde é produzido (Grant & Loake, 2000). Este radical pode reagir com metais de transição, altera-los e assim afectar a actividade das enzimas que contêm estes metais (Vranová *et al.*, 2002).

Uma outra consequência do aumento de EROs nas células pode ser a indução da **resposta de hipersensibilidade**. A resposta de hipersensibilidade (RH) é definida como um processo muito complexo de resposta, que culmina com a necrose do tecido no local da infecção. Este processo inclui a síntese de compostos antimicrobiais, síntese de enzimas hidrolíticas que atacam fungos e bactérias, alterações na síntese de proteínas estruturais entre outras alterações (Mehdy, 1994). Muitas destas respostas, devem-se à activação de genes específicos que, de uma maneira geral, são conhecidos como genes de defesa. No entanto, muitos dos rápidos processos associados RH envolvem a activação de compostos preexistentes e não tanto a expressão de genes.

São diversos os estudos que têm permitido relacionar a produção de EROs com esta resposta de defesa. A morte celular nas plantas está especialmente bem estudada durante a reacção de hipersensibilidade que ocorre tipicamente durante interacções incompatíveis entre plantas e patogénios (Lamb & Dixon, 1997). Estudos realizados demonstraram que a indução da morte celular no local do ataque do patogénio coincidia com o disparo oxidativo, que tem sido proposto ter um papel central no desenvolvimento da morte das células hospedeiras durante a RH (Doke, 1997; Grant & Loake, 2000). Verificou-se também que, a inibição de mecanismos antioxidantes endógenos, usando agentes farmacológicos específicos, aumentava a concentração de EROs o que fazia aumentar os níveis de morte celular (Levine *et al.*, 1994). Em muitas interacções incompatíveis, verificou-se que produção de EROs era frequentemente a primeira resposta detectada, ocorrendo esta resposta em menos de cinco minutos após infecção pelo patogénio (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Experiências realizadas em

células de tabaco tratadas com H_2O_2 permitiram verificar a indução da morte celular (Houot *et al.*, 2001). No entanto, em alguns sistemas celulares estudados, as EROs fornecidas exogenamente, não eram suficientes para activar a morte celular típica da RH nas plantas, o que indicou que as EROs não actuavam sozinhas mas, necessitavam de outros factores. Estudos realizados por Mittler *et al.*, (1999), demonstraram existir uma acumulação de ácido salicílico (AS) durante a RH, que permitia uma maior acumulação de EROs, dado que esta molécula inibe a actividade da CAT e da APX (Chen *et al.*, 1993; Kauss & Jeblick, 1996). Outros estudos, porém, demonstram que é a presença de H_2O_2 que estimula a produção de AS (León *et al.*, 1995), ficando por esclarecer se a activação das defesas é feita apenas via H_2O_2 , ou se é feita pelo H_2O_2 mas via AS ou se existem estas duas possibilidades (Wu *et al.*, 1997).

Durante a indução da RH, ocorre um conjunto complexo de fenómenos como a movimentações de iões, como K^+ e Ca^{2+} , e/ou fosforilações/desfosforilações de proteínas. O estudo destes fenómenos permitiu verificar que inibidores de Ca^{2+} ou de canais de Ca^{2+} , bem como inibidores de cinases impediam o aumento de EROs (Greenberg, 1997). Em particular, o Ca^{2+} parece ter um papel importante na morte celular uma vez que aumentos de cálcio intracelular parecem ser um factor importante na morte celular mediada por EROs (Grant & Loake, 2000). Experiências realizadas demonstram que presença de inibidores dos canais de Cálcio inibe a morte celular e a presença de ionóforos estimula-a mas apenas na presença de cálcio externo (Alvarez & Lamb, 1997), o que indicou que localização das reservas de cálcio seria provavelmente extracelular (Grant & Loake, 2000).

No caso de infecção por um patógeno, o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade tem um papel de defesa muito importante, pois priva o patógeno de nutrientes confinando o seu crescimento a uma pequena região da planta (Mehdy, 1994).

A planta para além de desenvolver a RH, tem a capacidade de adquirir resistência “imunidade” a bactérias, vírus ou fungos após uma primeira infecção (Collinge *et al.*, 2001). Na realidade, após o estabelecimento da RH, pode ocorrer o estabelecimento de imunidade em todos os tecidos da planta a infecções secundárias a que se dá o nome de **resistência sistémica adquirida (RSA)** (Grant & Loake, 2000). Esta defesa distingue-se das outras pelo largo espectro de actuação, bem como pelo padrão típico de genes induzido, embora este padrão seja diferente de planta para planta

(Ryals *et al.*, 1994; Ryals *et al.*, 1996). Estudos realizados em folhas de tabaco, demonstraram que a sua inoculação com o vírus do mosaico do tabaco provocou não só o aparecimento de uma lesão local, mas também reduziu a severidade de infecções posteriores com o mesmo vírus em zonas distais do local da primeira infecção (Ross, 1961). Neste mecanismo de defesa, o AS parece desempenhar um papel importante. Verificou-se que após uma infecção, os níveis endógenos de AS aumentavam localmente e sistemicamente e, no floema, estes níveis aumentavam ainda antes de ocorrer o estabelecimento da RSA (Heil & Bostock, 2002). Por outro lado, a presença de AS exógeno induzia a RSA e os seus genes. Estudos realizados em plantas de tabaco transgénicas contendo o gene *nahG* de bactéria, que codifica uma hidroxilase do AS, que converte o AS a catecol, demonstraram que, estas plantas que são incapazes de acumular o AS, ficavam impossibilitadas de desenvolver a SAR quando infectadas com o vírus do mosaico do tabaco. Assim sendo, o AS parecia ser uma molécula essencial no desenvolvimento da RSA (Gaffney *et al.*, 1993). No entanto, estudos mais recentes (Vernooij *et al.*, 1994), indicaram que o sinal responsável pela resposta não seria apenas o AS mas também estariam envolvidos outros sinais sistémicos (Heil & Bostock, 2002). Pensa-se que o AS que se acumula durante a RSA inibe a actividade da CAT o que faz elevar os níveis de H_2O_2 , que por sua vez permite uma maior acumulação de proteínas *PR* associada à RSA e permite desencadear outras respostas de defesa (Chen *et al.*, 1993; Ryals *et al.*, 1996; Collinge *et al.*, 2001).

Em batateira, os níveis de AS nas células são elevados quando comparados com os níveis apresentados por outras espécies como o tabaco ou *Arabidopsis* e verificou-se que a aplicação exógena de AS não aumentava a resistência contra o *Phytophthora infestans* (Coquoz *et al.*, 1995). Para além disso, embora a SAR possa ser induzida em batateira por certos patógenos ou eliciadores, não foram observados aumentos endógenos de AS em folhas não tratadas (Coquoz *et al.*, 1995). A diferença destes resultados com os encontrados em tabaco e *Arabidopsis* (em que o aumento de AS está associado ao estabelecimento de RSA), são evidências de que a indução da RSA em batateira ocorre de forma diferente. Experiências realizadas por Yu *et al.* (1997), demonstraram que as batateiras, apesar de possuírem níveis elevados de AS, não possuem um mecanismo efectivo de percepção e transdução desse sinal, e assim, a indução da RSA parecia envolver a activação de um mecanismo molecular para aumentar a sensibilidade da planta ao SA e não para aumentar da biossíntese de SA como em tabaco ou *Arabidopsis* (Yu *et al.*, 1997).

Em todas estas respostas de defesa, o H_2O_2 parece estar envolvido o que levou a pensar nesta molécula como molécula sinal que coordenava as defesas da célula. Apesar de menos reactiva que O_2^- , o H_2O_2 é uma molécula mais importante na propagação do dano oxidativo uma vez que é uma molécula móvel, que se difunde rapidamente através das membranas biológicas, para locais distantes do seu local de produção (Apostol *et al.*, 1989). Observações recentes demonstraram que o H_2O_2 é transportado do apoplasto para o citosol através de canais de água, as aquaporinas (Pastori & Foyer, 2002). Mas, esta molécula, parece também estar envolvida e ter um papel fundamental na coordenação de muitos dos mecanismos de resposta da célula mediando a aquisição de tolerância ao stresse biótico a abiótico (fig. 27). Verificou-se que o fornecimento exógeno de H_2O_2 tornava as plântulas do milho tolerantes ao frio e o tratamento de estacas nodais de batateira com H_2O_2 tornava-as resistentes ao choque térmico. Estes estudos, confirmaram que o H_2O_2 induzia tolerância ao frio e ao calor. Verificou-se também que esta molécula induziu alguns genes de defesa como glutathione transferase, a glutathione peroxidase e proteínas *PR* (Vranová *et al.*, 2002). Por exemplo, o tratamento de folhas de tabaco com H_2O_2 exógeno induzia a expressão do gene *PR-1* (Wu *et al.*, 1997). O H_2O_2 apresentou também, quando em grandes concentrações, actividade microbiana directa, contribuindo também para o reforço estrutural das paredes celulares, quer pela indução da ligação cruzada dos componentes da parede celular, quer pelo aumento da formação de lenhina na célula (Hammond- Kosack & Jones, 2000). O H_2O_2 também está relacionado com o desenvolvimento da morte celular. Experiências demonstraram que a aplicação de H_2O_2 exógeno induzia a morte celular de um modo dependente da dose e do tempo. No entanto, outros estudos indicaram que as concentrações geradas pelas células durante as respostas incompatíveis são muito inferiores às necessárias para ocorrer a morte celular (Able *et al.*, 2000). Níveis na ordem dos picomolar são, de acordo com estudos realizados por Able *et al.* (2000) produzidos durante interacções incompatíveis. Assim, o H_2O_2 não será o único responsável pela morte celular embora possa ter papel indirecto na sinalização destes acontecimentos celulares.

Estudos realizados por Lopez-Huertas *et al.* (2000), demonstraram que vários stresses (ferimentos, ataque por patogénios) que geram H_2O_2 como molécula sinal, levavam a uma proliferação de peroxissomas pela indução de genes necessários para a biogénese deste organelo que contém uma grande variedade de moléculas e enzimas

concentrações elevadas desencadeia HR levando à morte das células vegetais (Chamnongpol *et al.*, 1998). De forma a permitir este papel dual, os níveis de EROs intracelulares, nomeadamente os de H_2O_2 , devem estar controlados rigidamente, sendo esse controlo efectuado pelos sistemas antioxidantes das células.

4- Mecanismos de defesa da planta face ao ataque de patógenios

Um patógeno vegetal define-se como sendo um organismo que, para completar parte ou a totalidade do seu ciclo de vida, cresce numa planta causando-lhe prejuízo (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Existem essencialmente dois tipos de patógenios relativamente ao seu modo de vida: os necrotróficos e os biotróficos. Os **necrotróficos**, obtêm os nutrientes matando e posteriormente consumindo as células do tecido hospedeiro, usando toxinas e enzimas que destroem os tecidos em grandes quantidades. Os **biotróficos** invadem o tecido vivo e adquirem nutrientes do tecido hospedeiro sem causar dano excessivo (Collinge *et al.*, 2001). Estes últimos patógenios têm de ser capazes de suprimir a activação das defesas do hospedeiro, manipulando a percepção ou transdução de sinal do hospedeiro, e devem ser resistentes às defesas antimicrobiais produzidas pela planta hospedeira (Collinge *et al.*, 2001).

A interacção entre plantas e patógenios pode levar a uma infecção com sucesso (resposta compatível), ou sem sucesso (resposta incompatível). Nas **interacções compatíveis** (hospedeiro susceptível e/ou patógeno virulento), o patógeno pode espalhar-se a outras áreas da planta sem desencadear os mecanismos de resposta da planta e desencadear a doença (Bowler *et al.*, 1992). Nas **interacções incompatíveis** (hospedeiro resistente e patógeno avirulento), as infecções provocadas por vírus, bactérias ou fungos iniciam um conjunto de respostas localizadas nas células infectadas, bem como nas células que as rodeiam (Heil & Bostock, 2002). Estas respostas têm como função, a formação de condições desfavoráveis para o crescimento e reprodução do patógeno. Esta incompatibilidade é estabelecida pela acção de pares de genes correspondentes: o gene dominante de resistência das plantas (R) e o gene dominante de avirulência do patógeno (Avr) (Lamb, 1994). Para ocorrer a defesa (em interacções incompatíveis) são necessárias duas condições: em primeiro lugar o patógeno deve ter um gene denominado gene de avirulência (Avr), em segundo a planta deve conter o gene denominado gene de resistência (R), que confere à planta o reconhecimento específico de um patógeno com gene Avr (Greenberg, 1997). Estes dois genes devem

estar presentes para limitar o crescimento e desenvolvimento do patógeno, sendo este fenómeno designado por **resistência gene para gene** (Greenberg, 1997) (fig. 28).

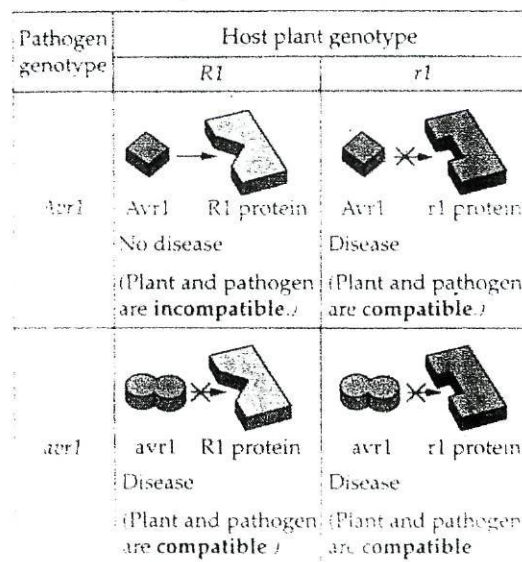


Fig. 28 – Modelo gene para gene. Para ocorrer resistência (incompatibilidade) é necessário ocorrer complementaridade entre genes dominantes do hospedeiro (*Avr*) e da planta (*R*). Qualquer alteração ou perda de gene *R* da planta ou do gene *Avr* do patógeno leva a que ocorra doença (compatibilidade) (retirado de Hammond-Kosack & Jones, 2000).

A interacção entre estes dois genes vai levar à ocorrência de modificações na célula, como alterações de permeabilidade da membrana e do estado de fosforilação/desfosforilação de determinadas proteínas. Estas alterações, por sua vez, levam à activação de genes de defesa, aumento de produção de EROs e fitoalexinas.

Relativamente à resistência ou susceptibilidade das plantas a uma infecção, podem-se considerar dois níveis de especificidade. Quando todas as plantas de uma determinada espécie são resistentes à infecção de um patógeno em particular denomina-se de **resistência não hospedeiro**. Esta situação acontece quando as espécies vegetais são incapazes de suportar as estratégias de vida dos patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Quando diferentes plantas de uma mesma espécie apresentam diferentes especificidades a diferentes raças da mesma espécie de patógeno denomina-se por **resistência raça/cultivar** (Collinge *et al.*, 2001).

Em geral, as plantas defendem-se do ataque de patógenos através, ou de características estruturais, que actuam como barreiras físicas e impedem a penetração do patógeno (cutícula, ceras), ou por meio de reacções bioquímicas, que ocorrem nas células e que levam, por exemplo, à produção de substâncias tóxicas que inibem o

desenvolvimento do patogénio (Hammond-Kosak & Jones, 2000). Outro exemplo de reacção química, típica de interacções planta-patogénio é disparo oxidativo, ou seja, um aumento acentuado dos níveis de EROs nas células (Doke, 1997).

A complexidade funcional, espacial e temporal das defesas das plantas contra os patogénios, tem sido cada vez mais estudada. A complexidade funcional, inicia-se com a percepção dos sinais exógenos do patogénio, continua com os mecanismos de percepção e transdução de sinal e pode resultar numa extensa reprogramação do metabolismo celular que pode envolver mudanças na actividade dos genes (Somssich & Hahlbrock, 1998). A organização espacial destas reacções de defesa, é extremamente complexa e afecta a compartimentação intracelular, as células directamente afectadas e os tecidos que a circundam. Apesar de toda esta complexidade, segundo Somssich & Hahlbrock (1998), a resposta da planta a um patogénio pode ser dividida em quatro etapas: reconhecimento, transdução de sinal, disparo oxidativo e mudanças de actividade génica. O rápido **reconhecimento** de um potencial invasor é um pré-requisito para o início de uma eficiente resposta de defesa. Isto é conseguido através do reconhecimento de moléculas sinal específicas que podem ser ou do patogénio, ou da parede das células vegetais. Estas moléculas denominam-se respectivamente, eliciadores exógenos ou endógenos. Estes eliciadores, são geralmente compostos de baixo peso molecular que, ou são secretados pelo patogénio, ou são libertados pelo patogénio após actuação das defesas da planta ou são moléculas libertadas pelas células hospedeiras após acção de enzimas produzidas pelo patogénio (Collinge *et al.*, 2001). O eliciador componente da parede das hifas de *P. infestans*, causa indução local do disparo oxidativo bem como uma resistência sistémica adquirida em batateira (Park H-J *et al.*, 1998). Trabalhos realizados por Kamoun *et al.* (1998), demonstraram que o patogénio *P. infestans* produz uma proteína extracelular de 10 KD, que serve como eliciador, denominada de INF1 e que funciona como factor de avirulência na interacção entre este patogénio e *Nicotiana benthamiana*.

A complexidade da percepção de sinal reflecte-se ao nível da **transdução de sinal** o que possibilita o estabelecimento de uma complexa rede de sinais que iniciam a generalidade das respostas de defesa. Após o reconhecimento do patogénio, as primeiras reacções detectáveis são a formação de EROs e abertura de canais de iões específicos que permitem o fluxo de iões que terão papel importante na activação de outros processos relacionados com a resposta da célula (Somssich & Hahlbrock, 1998) (fig. 29). Ocorrem também alterações da polaridade da membrana e mudanças de actividade

de várias enzimas como NADP oxidases, fosfolipases e cinase (Somssich & Hahlbrock, 1998). Por exemplo, as fosfolipases induzidas poderão actuar nos ácidos gordos insaturados da membrana, tendo como consequência a libertação de ácido linolénico, que serve de substrato para a produção de ácido jasmónico e metiljasmonato entre outras moléculas. Estes compostos e os seus percursos actuam muitas vezes como moléculas sinal sob várias condições de stresse nomeadamente ataque de patogénios (Somssich & Hahlbrock, 1998) (fig. 29). Na activação do disparo oxidativo estão provavelmente envolvidas cadeias de fosforilação e desfosforilação de proteínas, uma vez que inibidores de cinases bloqueiam a acumulação de EROs.

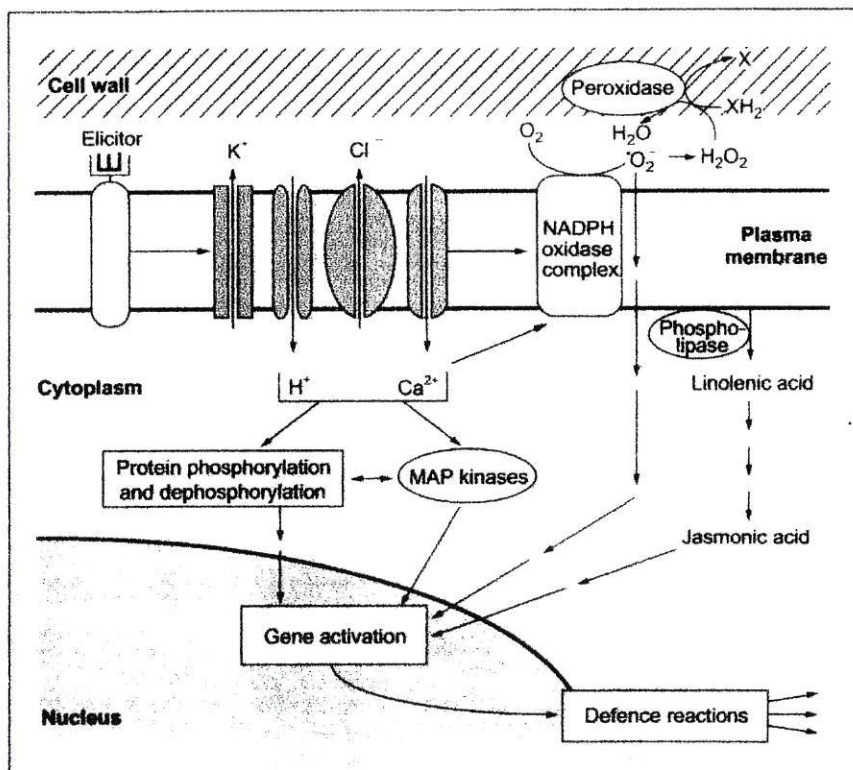


Fig. 29 - Principais componentes da via da transdução de sinal desde a percepção de um eliciador até à activação de genes em células de cultura de salsa. O reconhecimento de um eliciador pelo seu receptor na membrana celular, rapidamente estimula o influxo de Ca^{2+} e H^+ e o efluxo de K^+ e Cl^- . Estes fluxos de íons são um pré-requisito para a activação de proteínas cinases específicas e para a fosforilação/desfosforilação de várias proteínas. A formação de EROs é necessária para ocorrer um conjunto de respostas de defesa como a ligação cruzada dos componentes da parede celular e para activação de vários genes envolvidos na síntese de vários compostos de defesa (retirado de Somssich & Hahlbrock, 1998).

Esta complexa actividade bioquímica, desencadeada por estes acontecimentos iniciais, é ainda mais amplificada em estádios posteriores da resposta em que as vias de transdução de sinal chegam ao núcleo, onde podem estar envolvidas na activação ou inactivação de diversos genes envolvidos nas respostas de defesa (Somssich & Hahlbrock, 1998).

São vários os estudos realizados no sentido de estudar e compreender melhor as interacções que ocorrem entre as plantas e os patogénios que as invadem. Estudos realizados em várias espécies de plantas e com vários tipos de patogénios, demonstraram que, folhas e outras partes da plantas, quando sujeitas à actuação de patogénios ou eliciadores derivados de patogénios respondem com uma alteração do metabolismo levando à formação de radicais superóxido e consequentemente de radicais H_2O_2 (Medhy, 1994). Em rosa, o tratamento de células com o eliciador preparado a partir de parede celular de *Phytophthora*, induziu o aumento de O_2^- e H_2O_2 (Auh & Murphy, 1995). Em soja, o tratamento com o eliciador β - glucano induziu uma rápida produção de H_2O_2 (Mithofer *et al.*, 1997).

Em dois trabalhos clássicos, Doke descreve a produção de EROs durante a interacção da batateira como *P. infestans*. A inoculação de fatias de tubérculo com zoósporos ou eliciadores levaram a uma rápida estimulação da produção de O_2^- (Doke, 1983). Os tubérculos quando sujeitos a infecção com *P. infestans* mostraram, *in vitro*, um aumento de actividade da enzima NADPH oxidase associada à membrana independentemente da síntese de proteínas, mas necessitando de componentes como o Ca^{2+} e ATP (Doke & Miura, 1995). Investigações posteriores mostraram que o disparo oxidativo era rápido quer em tubérculos quer em folhas. Folhas de batateira, quando tratadas com eliciador de *P. infestans*, demonstraram um disparo oxidativo e o desenvolvimento da RSA e apresentaram maior produção de O_2^- comparativamente com folhas não tratadas. Este aumento de produção de O_2^- surgiu desde o 1º ao 7º dia após o tratamento com eliciador (Park H-J *et al.*, 1998). Para além disto, verificaram-se outros aumentos de actividade da SOD e PX respectivamente no 2º e 3º dia após tratamento com eliciador (Park H-J *et al.*, 1998).

O disparo oxidativo em células vegetais ocorre geralmente em duas fases, uma inicial que se inicia poucos minutos após o contacto com o patogénio, e uma fase secundária, que só ocorre algumas horas após infecção. As interacções incompatíveis iniciam ambas as fases, enquanto que, nas interacções compatíveis apenas a primeira é induzida (Levine *et al.*, 1994). Em células de tabaco e de soja (referências em Alvarez

& Lamb, 1997), o tratamento com patogénios avirulentos estimularam duas fases de acumulação de H_2O_2 . A primeira fase (1 a 2 horas) foi transitória e iniciada por estirpes de patogénios virulentos e avirulentos. A segunda fase (2 a 5 horas), foi prolongada e específica de interações incompatíveis. Esta segunda fase está relacionada com influxos muito grandes de H^+ e efluxos de K^+ típicos de interações incompatíveis e que podem levar à morte celular (Alvarez & Lamb, 1997). Pensa-se que apenas esta segunda fase, é induzida por factores específicos, induzidos após a expressão de genes Avr nos tecidos das plantas (Baker *et al.*, 1993)

Estas observações suportam a ideia que as EROs são fundamentais no processo de indução de defesas na planta contra o ataque de patogénios. No entanto, alguns patogénios adquiriram a capacidade de suprimir esta indução de EROs, não activam as defesas das plantas o que lhes permite infectar com sucesso as plantas (Doke *et al.*, 1991).

5- Mecanismos de defesa da planta face a situações de secura

A secura, pode ser induzida por muitas condições ambientais nomeadamente, em períodos de pouca ou nenhuma queda de chuva, em ambientes salinos, em ambientes de temperaturas muito baixas, entre outros (Bray *et al.*, 2000). A resposta da planta a esta falta de água, vai depender da duração e da intensidade do stresse, bem como da possibilidade que a planta teve para se aclimatizar a esta situação (Bray *et al.*, 2000). Vários genes são induzidos em resposta à secura a nível transcripcional e, pensa-se que os seus produtos funcionam na resposta e na tolerância ao stresse. A função dos genes induzidos pode ser protectora, se induz proteínas que funcionam na tolerância ao stress, ou reguladora, se induz factores proteicos envolvidos na regulação da transdução de sinal. Entre os genes induzidos encontram-se os que codificam, por exemplo, proteinases, osmoprotectores, osmoreguladores, enzimas antioxidantes, proteínas de membrana, cinases ou mesmo factores de transcrição.

A produção de solutos compatíveis (ex. prolina, betaína, manitol) permite que, uma vez em maior concentração dentro da célula, retenham a água no seu interior. A síntese de aquaporinas e outras proteínas transmembranares permite a passagem da água pela parede celular para o interior das células. Outra das respostas comuns à secura é o fecho dos estomas. Nesta resposta, o ácido absísico (ABA) tem um papel central uma vez que estimula as células guarda dos estomas a fechar, reduzindo a perda de água,

Esta complexa actividade bioquímica, desencadeada por estes acontecimentos iniciais, é ainda mais amplificada em estádios posteriores da resposta em que as vias de transdução de sinal chegam ao núcleo, onde podem estar envolvidas na activação ou inactivação de diversos genes envolvidos nas respostas de defesa (Somssich & Hahlbrock, 1998).

São vários os estudos realizados no sentido de estudar e compreender melhor as interacções que ocorrem entre as plantas e os patogénios que as invadem. Estudos realizados em várias espécies de plantas e com vários tipos de patogénios, demonstraram que, folhas e outras partes da plantas, quando sujeitas à actuação de patogénios ou eliciadores derivados de patogénios respondem com uma alteração do metabolismo levando à formação de radicais superóxido e conseqüentemente de radicais H_2O_2 (Medhy, 1994). Em rosa, o tratamento de células com o eliciador preparado a partir de parede celular de *Phytophthora*, induziu o aumento de O_2^- e H_2O_2 (Auh & Murphy, 1995). Em soja, o tratamento com o eliciador β - glucano induziu uma rápida produção de H_2O_2 (Mithofer *et al.*, 1997).

Em dois trabalhos clássicos, Doke descreve a produção de EROs durante a interacção da batateira com *P. infestans*. A inoculação de fatias de tubérculo com zoósporos ou eliciadores levaram a uma rápida estimulação da produção de O_2^- (Doke, 1983). Os tubérculos quando sujeitos a infecção com *P. infestans* mostraram, *in vitro*, um aumento de actividade da enzima NADPH oxidase associada à membrana independentemente da síntese de proteínas, mas necessitando de componentes como o Ca^{2+} e ATP (Doke & Miura, 1995). Investigações posteriores mostraram que o disparo oxidativo era rápido quer em tubérculos quer em folhas. Folhas de batateira, quando tratadas com eliciador de *P. infestans*, demonstraram um disparo oxidativo e o desenvolvimento da RSA e apresentaram maior produção de O_2^- comparativamente com folhas não tratadas. Este aumento de produção de O_2^- surgiu desde o 1º ao 7º dia após o tratamento com eliciador (Park H-J *et al.*, 1998). Para além disto, verificaram-se outros aumentos de actividade da SOD e PX respectivamente no 2º e 3º dia após tratamento com eliciador (Park H-J *et al.*, 1998).

O disparo oxidativo em células vegetais ocorre geralmente em duas fases, uma inicial que se inicia poucos minutos após o contacto com o patogénio, e uma fase secundária, que só ocorre algumas horas após infecção. As interacções incompatíveis iniciam ambas as fases, enquanto que, nas interacções compatíveis apenas a primeira é induzida (Levine *et al.*, 1994). Em células de tabaco e de soja (referências em Alvarez

& Lamb, 1997), o tratamento com patogénios avirulentos estimularam duas fases de acumulação de H_2O_2 . A primeira fase (1 a 2 horas) foi transitória e iniciada por estirpes de patogénios virulentos e avirulentos. A segunda fase (2 a 5 horas), foi prolongada e específica de interacções incompatíveis. Esta segunda fase está relacionada com influxos muito grandes de H^+ e efluxos de K^+ típicos de interacções incompatíveis e que podem levar à morte celular (Alvarez & Lamb, 1997). Pensa-se que apenas esta segunda fase, é induzida por factores específicos, induzidos após a expressão de genes Avr nos tecidos das plantas (Baker *et al.*, 1993)

Estas observações suportam a ideia que as EROs são fundamentais no processo de indução de defesas na planta contra o ataque de patogénios. No entanto, alguns patogénios adquiriram a capacidade de suprimir esta indução de EROs, não activam as defesas das plantas o que lhes permite infectar com sucesso as plantas (Doke *et al.*, 1991).

5- Mecanismos de defesa da planta face a situações de secura

A secura, pode ser induzida por muitas condições ambientais nomeadamente, em períodos de pouca ou nenhuma queda de chuva, em ambientes salinos, em ambientes de temperaturas muito baixas, entre outros (Bray *et al.*, 2000). A resposta da planta a esta falta de água, vai depender da duração e da intensidade do stresse, bem como da possibilidade que a planta teve para se aclimatizar a esta situação (Bray *et al.*, 2000). Vários genes são induzidos em resposta à secura a nível transcripcional e, pensa-se que os seus produtos funcionam na resposta e na tolerância ao stresse. A função dos genes induzidos pode ser protectora, se induz proteínas que funcionam na tolerância ao stress, ou reguladora, se induz factores proteicos envolvidos na regulação da transdução de sinal. Entre os genes induzidos encontram-se os que codificam, por exemplo, proteinases, osmoprotectores, osmoreguladores, enzimas antioxidantes, proteínas de membrana, cinases ou mesmo factores de transcrição.

A produção de solutos compatíveis (ex. prolina, betaína, manitol) permite que, uma vez em maior concentração dentro da célula, retenham a água no seu interior. A síntese de aquaporinas e outras proteínas transmembranares permite a passagem da água pela parede celular para o interior das células. Outra das respostas comuns à secura é o fecho dos estromas. Nesta resposta, o ácido absísico (ABA) tem um papel central uma vez que estimula as células guarda dos estomas a fechar, reduzindo a perda de água,

mas também, reduzindo a disponibilidade de CO₂ para a fotossíntese que, como já descrito, pode causar danos nas células (Bray *et al.*, 2000). O ABA também parece ter um papel importante na indução de alguns genes de resposta a este stresse. Estudos realizados por Jiang & Zhang (2002), em folhas destacadas de milho, indicaram que, quando em situação de stresse hídrico, após um aumento dos níveis de ABA na célula, ocorre um aumento dos níveis de EROs, que por sua vez induzem um aumento de actividade das enzimas antioxidantes.

Experiências realizadas em ervilheira em condições de secura, demonstraram que estas plantas apresentavam níveis reduzidos de fotossíntese e de transpiração, aumentos de resistência dos estomas, baixos níveis de clorofila, carotenoides e proteínas solúveis (Moran *et al.*, 1994). Para além disto, verificou-se um aumento significativo de EROs e uma alteração dos níveis de enzimas antioxidantes. O stresse hídrico levou a uma diminuição acentuada da actividade da CAT, no entanto, a actividade das enzimas GPX, APX e SOD, praticamente não sofreram alterações (Moran *et al.*, 1994). Para além destas alterações verificou-se um aumento de concentração de metais que ficaram disponíveis para participar, por exemplo, na relação de Fenton, com todas as consequências já discutidas no trabalho (Moran *et al.*, 1994).

Em trigo, a exposição a este stresse provocou aumentos dos níveis do radical 'O₂' nos cloroplastos, e elevadas taxas de síntese de glutathione reductase, no entanto, verificou-se uma diminuição da actividade da catalase (Bartosz, 1997). Em tomateiros sujeitos a secura verificou-se uma forte indução da Cu/ZnSOD citosólica, no entanto, os níveis de Cu/ZnSOD cloroplastideal mantiveram-se inalterados (Perl-Treves & Galun, comunicação pessoal). Nesta planta, a secura levou à indução de transcritos para SOD citosólicas mas não para SOD cloroplastideais (Perl-Treves & Galun, 1991).

Para além de mudanças de actividade de enzimas, o stresse causado pela secura induz outras alterações. Em *Tortura ruralis* (espécie tolerante à secura) e *Cratoneuron filicinum* (espécie sensível à secura) verificou-se um aumento dos níveis de peroxidação lipídica, embora este aumento tenha sido superior na espécie sensível à secura (Bowler *et al.*, 1992).

É claro que a resposta ao stresse não pode ser visto como algo estanque e bem definido para cada tipo de stresse dado que, as plantas de uma forma geral, estão sujeitas simultaneamente a vários tipos de stresses. Estudos realizados demonstraram que, muitas vezes, as respostas de defesa a diferentes stresses se cruzam, e por isso, a

exposição a dois ou mais stresses nem sempre é mais nefasto para a planta, podendo mesmo aumentar a capacidade de resposta da planta e assim aumentar a sua resistência.

6- Tolerância cruzada

As plantas respondem ao stress biótico e abiótico despolotando uma rede de acontecimentos que se inicia com a percepção do stress e termina com a expressão de um conjunto de genes alvo (Pastori & Foyer, 2002) (fig. 30).

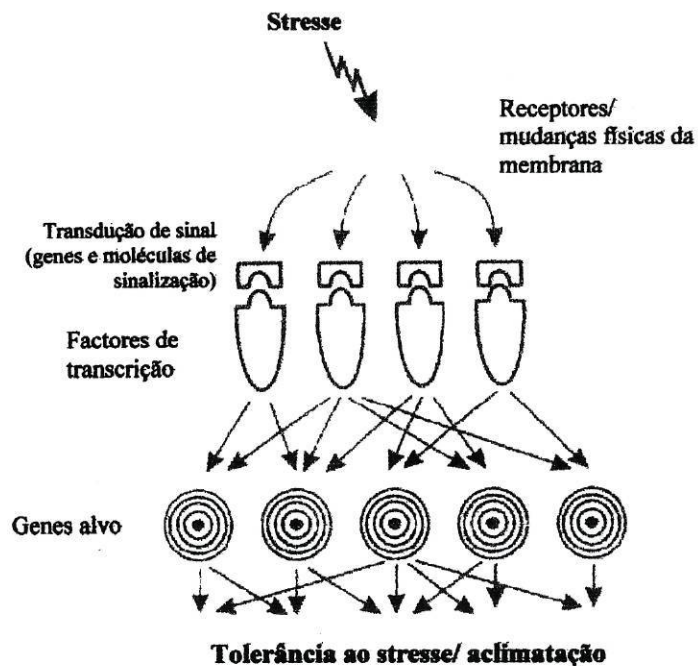


Fig. 30 – Esquema representativo da relação das respostas de defesa ao stress. Os receptores presentes em muitas membranas celulares podem responder a mudanças no ambiente e desencadear a transdução de sinal. A via de transdução de sinal desencadeada por um stress leva a um determinado conjunto de respostas como a expressão de determinados genes. Muitas vezes as vias de transdução de sinal desencadeadas por diferentes stresses levam a respostas comuns (adaptado de Pastori & Foyer, 2002).

Muitas plantas utilizam vias e componentes comuns na resposta a vários stresses. Este fenómeno, conhecido por tolerância cruzada, permite a aclimatação das plantas a diferentes stresses após exposição a um stress específico (Pastori & Foyer, 2002). Por outras palavras, esta tolerância verifica-se quando a presença a um primeiro stress induz o sistema anti-oxidativo num compartimento comum aquele que um segundo stress iria induzir. Desta forma, quando a planta é colocada na segunda

situação de stresse, reage muito “melhor”, o que indicou que o primeiro stresse de certa forma “preparou” a planta para o segundo stresse.

No caso do stresse provocado pela secura, pelo frio ou pelo sal, uma das consequências mais comuns nas plantas é a desidratação. Relativamente a esta situação, já foi descoberto uma sequência no DNA, um elemento que responde à desidratação (DRE), que é induzida por estes stresses e que conduz à expressão de genes específicos na protecção da planta contra estes danos (Pastori & Foyer, 2002). Estudos realizados em tabaco (Rizhsky *et al.*, 2002), demonstraram que a resposta da planta à combinação de dois stresses, como a secura e o calor, é diferente da resposta das plantas a cada um destes factores individualmente. Este comportamento também se verificou para outros stresses como frio, salinidade ou o ataque de patogénios (Rizhsky *et al.*, 2002). Estas diferentes respostas sugerem que a combinação de stresses resulta na activação de um programa genético único que é diferente do activado por cada stresse individualmente (Rizhsky *et al.*, 2002). Na tabela 5 estão exemplificados algumas espécies de plantas e respectivos stresses que, quando actuam em conjunto, desencadeiam a tolerância cruzada.

Tabela 5- Exemplos de tolerâncias cruzadas encontradas em algumas plantas de cultivo (adaptado de Bowler *et al.*, 1992).

Espécie	Seleção	Tolerância cruzada	Enzimas envolvidas
<i>Coryza bonariensis</i>	Paraquato	Atrazina, SO ₂ , fotoinibição	SOD, GR, APX
<i>Gossypium hirsutum</i>	Secura	Paraquato	GR
<i>Nicotiana tabacum</i>	Ozono	Paraquato	SOD, GR
	Paraquato	SO ₂ , <i>Cercospora</i>	SOD
<i>Zea mays</i>	Secura	Paraquato, SO ₂	SOD, GR

É possível que diferentes stresses induzam respostas celulares distintas mas também comuns, sendo a resposta final determinada pelo espectro particular das respostas. Uma vez que o stresse oxidativo é uma consequência comum a todos os tipos de stresses, é imperativo o conhecimento das vias de controlo de transcrição para melhor compreender as respostas das plantas ao stresse (Pastori & Foyer, 2002).

Também neste mecanismo, o H_2O_2 parece desempenhar um papel importante, uma vez que é uma molécula que medeia a resposta em diferentes stresses.

Embora o nível de tolerância cruzada observada não seja suficiente para ter qualquer valor agronómico, pode facilitar o estudo e ajudar a desvendar mais aprofundadamente os mecanismos de defesa das plantas (Bowler *et al.*, 1992).

7- *Solanum tuberosum* L.

A batateira é uma planta ancestral que foi domesticada na América do Sul tendo posteriormente sido dispersada pelo Homem por uma área considerável desde a altura em que os espanhóis aí chegaram, no século dezasseis (Hankes, 1992). Na Europa, a batateira surgiu nos finais do século dezasseis e, desde então, sofreu uma forte selecção artificial até cerca de 1750, altura em que Lineu descreve pela primeira vez a espécie europeia de batateira *Solanum tuberosum* L. (Hankes, 1992). Em Portugal, a intensificação da cultura da batateira terá ocorrido em meados do século XVIII (Barbosa, 1884).

A batateira utilizada neste trabalho pertence à espécie *Solanum tuberosum* L. cv. Desireé. É uma dicotiledónea, herbácea, anual que pertence à família das Solanáceas. É constituída por uma parte aérea e uma parte subterrânea. A parte aérea do caule é herbácea erecta nas primeiras fases do crescimento podendo tornar-se prostrada (Cutter, 1992). A porção subterrânea do caule é ramificada, desenvolvendo-se na sua extremidade, numa fase do seu desenvolvimento (a tuberização), os tubérculos. Segundo Cutter (1992), morfológicamente, os tubérculos são caules modificados, com um eixo encurtado e folhas muito pouco desenvolvidas. As folhas de *S. tuberosum* são compostas, imparapinuladas, surgindo entre os folíolos principais folíolos secundários, mais pequenos (Cutter, 1992). A folha é constituída por parênquima empaliçada e parênquima lacunoso. A epiderme consiste numa única camada de células com paredes sinuosas. Os estomas ocorrem em ambas as páginas da folha embora sejam mais abundantes no lado abaxial (Cutter, 1992). As flores agrupadas em cimeiras são pentaméricas; os frutos, são bagas com cerca de 1 a 3 cm de diâmetro, geralmente de cor verde tornando-se de cor avermelhada quando maduros (Hooker, 1986).

A propagação da batateira faz-se vegetativamente, a partir de tubérculos - "batata semente"- que ao desenvolverem, originam plantas geneticamente iguais à planta mãe. As batatas são uma das mais importantes colheitas a nível mundial a seguir

ao arroz (*Oryza sativa*), ao trigo (*Triticum aestivum*) e à cevada (*Hordeum vulgare*). Embora na Europa e no Norte da América seja utilizada principalmente sob forma de comida processada, como batatas fritas, nos países menos desenvolvidos ela representa um importante recurso alimentar e é cultivada por muitos agricultores (Hankes, 1992). A importância destes órgãos verifica-se pelo facto de 75 a 85% do total da matéria seca produzida pela planta ser acumulado nestes órgãos (Cutter, 1992). O tubérculo contém proteínas de alta qualidade, e quantidades substanciais de vitaminas, minerais, amido e outros elementos (Horton & Sawyer, 1985). Esta característica, combinada com a simplicidade do processo de propagação vegetativa e fácil armazenamento dos tubérculos (Fernie & Willmitzer, 2001), foram os principais factores que contribuíram para a popularidade da batata em países do terceiro mundo e para a sua importância a nível mundial. Assim sendo, o seu estudo e maior conhecimento serão da maior importância nomeadamente no sentido de desenvolver espécies mais resistentes às várias formas de stresse.

O controlo de doenças, é um pré-requisito para se conseguir manter e melhorar a qualidade das colheitas de batata. Dada a sua ampla distribuição, a ocorrência de doenças que afectam as colheitas e consequentes efeitos sociais e económicos que lhe advêm, têm sido um grande estímulo para melhorar o conhecimento acerca das patologias que afectam estas plantas (Hide & Lapwood, 1992). O míldo é uma das doenças mais importantes a ter em conta durante o desenvolvimento da batateira, no entanto, muitas outras doenças provocam grandes danos na planta (Hide & Lapwood, 1992). Em meados do século dezoito, a elevada ocorrência de folhas enroladas em culturas de batateira situadas na Alemanha e no Reino Unido levou a uma fraca colheita destas plantas e, em meados do século dezanove algumas doenças destruíram vastas colheitas em Nova York e Nova Inglaterra nos Estados Unidos. Um pouco mais tarde, uma epidemia catastrófica devastou as colheitas de batata na Irlanda o que teve como consequência a fome e a emigração em massa da população (Hide & Lapwood, 1992). Como se vê através destes exemplos, a batateira é uma planta sujeita a centenas de doenças causadas por bactérias, fungos, vírus ou micoplasmas, que podem causar sérios danos nas colheitas (Hide & Lapwood, 1992). Os patogénios podem atacar várias partes da planta como as folhas, o sistema radicular e os tubérculos e, desta forma, atacar a planta ao longo de todo o seu ciclo de vida afectando grandemente as colheitas. Entre os patogénios que infectam a batateira, é o *Phytophthora infestans* o objecto do nosso estudo.

8- *Phytophthora infestans*

O míldo é sem dúvida, a mais importante das doenças da batateira e aquela que mais danos sérios causa nas folhas e nos tubérculos (Butler & Jones, 1949). As primeiras referências a esta doença reportam ao ano de 1844, no entanto, a origem da doença permanece incerta. Provavelmente terá sido no México, onde esta doença é endémica em espécies no seu estado nativo, familiares das batateiras de cultivo (Butler & Jones, 1949). Uma vez no continente europeu, a doença ter-se-à espalhado rapidamente através da Holanda, norte de França e Alemanha (Butler & Jones, 1949). Em 1845, na Irlanda, este patogénio foi, por exemplo, responsável pela doença do míldo da batateira, que causou uma grande epidemia sem paralelo com outros países, e levou à migração de mais de um milhão de pessoas para os Estados Unidos e outros países. Hoje em dia, este patogénio continua a causar grandes perdas de colheitas, nomeadamente de batata, em todo o mundo (Buchanan *et al.*, 2000).

Este patogénio é um agente casual principalmente da batateira e tomateiro. Pertence à classe dos Phycomycetes, subclasse dos Oomycetes e ordem dos Peronosporares. Os oomycetes são um grupo diverso de organismos, muitos dos quais são patogénios de plantas e inclui aproximadamente cerca de 60 espécies do género *Phytophthora* (Kamoun *et al.*, 1999). Exibem um crescimento filamentosos sendo muitas vezes, incorrectamente denominados de fungos. Análises bioquímicas em conjugação com análises filogenéticas de sequências génicas de mitocôndrias e ribossomas, sugerem que os oomycetes partilham pouca afinidade taxonómica com fungos filamentosos (Kamoun *et al.*, 1999).

Estes patogénios são designados de hemibiotrófico uma vez que apresentam inicialmente uma fase biotrófica e posteriormente necrotrófica. As células das plantas apenas sobrevivem nas fases iniciais da infecção (Buchanan *et al.*, 2000).

A reprodução de um oomycete neste caso *Phytophthora*, pode ser realizado quer sexuadamente pelos oósporos (esporos sexuais) quer assexuadamente através da produção de zoósporos (esporos móveis assexuais), embora o segundo modo seja o mais frequente (fig. 31).

A infecção, ou seja, o processo mediante o qual o patogénio entra em contacto com os tecidos de um hospedeiro (Agrios, 1986), está dependente das condições atmosféricas para a esporulação e dispersão do patogénio. Para uma infecção de sucesso é necessário um clima com elevados níveis de humidade (Hide & Lapwood, 1992). O

ciclo de infecção de muitos oomycetes patogénios de plantas está bem caracterizado (fig. 31). Os primeiros sinais de infecção são similares em plantas que desenvolvem interacções susceptíveis ou resistentes. Tipicamente, a infecção inicia-se quando os zoósporos germinam na superfície das raízes ou das folhas. Alternativamente, em algumas espécies, os esporângios, o anterídeo e oogónio, suportados pelos esporangióforos, formam oósporos que podem germinar directamente sobre a superfície das plantas (fig. 31). Os tubos germinativos desenvolvem intercelularmente um micélio que tem a capacidade de absorver alimento (haustório) (Hield, 1943).

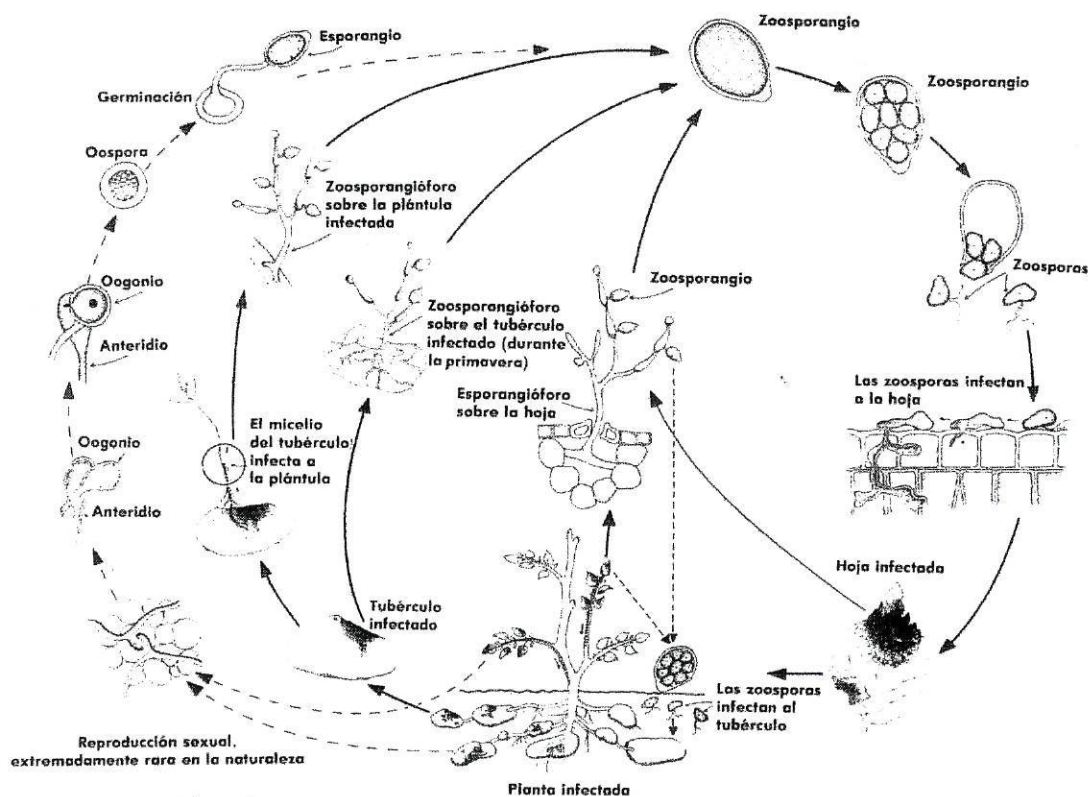


Fig 31 - Ciclo de infecção produzido por *Phytophthora infestans* em batateira onde é possível visualizar a reprodução sexual e assexuada deste patógeno bem como o mecanismo de infecção (retirado de Agrios, 1986).

A infecção pode ocorrer através de qualquer parte da epiderme mas é mais frequente ocorrer na superfície abaxial das folhas, através de ferimentos, pelas lenticelas ou pelas escamas externas dos “olhos” do tubérculo (Butler & Jones, 1949).

Relativamente à resistência das plantas a este tipo de infecção, as plantas podem ser classificadas como susceptíveis ou resistentes. Nas **plantas susceptíveis**, os haustórios expandem-se do local de penetração, para células vizinhas através dos

espaços intercelulares. Nas **plantas resistentes** o crescimento das haustórios é muitas vezes limitado a uma única célula (fig. 32) (Kamoun *et al.*, 1999).

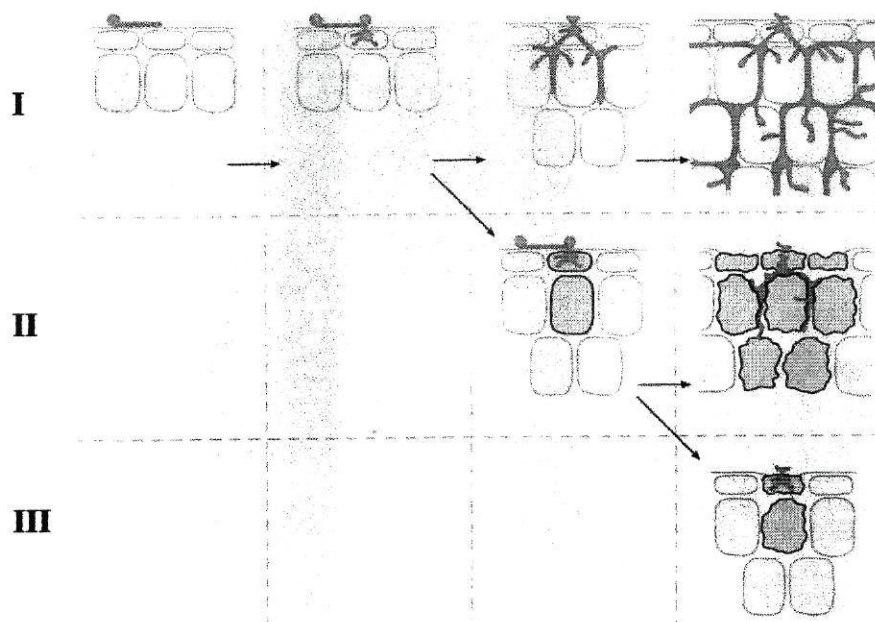


Fig. 32 – Esquema dos acontecimentos entre *P. infestans* e plantas suscetíveis e resistentes após infecção. Os estádios iniciais são semelhantes nos dois tipos de interações. Em plantas suscetíveis não ocorrem defesas visíveis (I), as hifas crescem no espaço intercelular e formam haustórios dentro das células do mesófilo. Em plantas resistentes, as defesas das células são activadas após penetração do patogénio (II). A RH é induzida e a hifa fica restrita no grupo de células mortas ou mesmo (II) ou mesmo na célula epidérmica por onde penetrou (esquema III). As lesões referidas no esquema do meio são visíveis macroscopicamente como manchas negras na folha. Em muitas plantas não hospedeiras (III) a RH é induzida tão rapidamente que apenas uma ou duas células são sacrificadas e macroscopicamente não se visualizam quaisquer sintomas (Kamoun *et al.*, 1999).

No nosso estudo, o *P. infestans*, foi utilizado para infectar plantas de *S. tuberosum* crescidas em condições de carência hídrica e de não carência hídrica.

9- Objectivos do trabalho

Após o reconhecimento de um patogénio e/ou a exposição das plantas a situações de secura, as plantas iniciam um conjunto de reacções de defesa nomeadamente a explosão oxidativa com formação de EROs. Para a planta desencadear mecanismos de defesa contra o stresse oxidativo terá de induzir a formação das enzimas do sistema antioxidante das células, de forma a manter controlados os níveis dessas mesmas EROs.

O trabalho desenvolvido teve por objectivo estudar o efeito da aplicação de uma suspensão de esporos de *P. infestans*, por pulverização, em plantas de *Solanum tuberosum* L. cv. Desireé crescidas em condições de não stresse. O efeito do tratamento com o patogénio foi apreciado através da análise do comportamento, de algumas enzimas do sistema antioxidante- superóxido dismutase, a catalase, a peroxidase do ascorbato- a nível de actividade e do padrão isoenzimático. O estudo pretendeu também estudar a resposta destas enzimas em plantas sujeitas ao mesmo agente patogénico mas quando em situação de stresse hídrico. O estudo da resposta das plantas à infecção do patogénio em situação de não carência hídrica e em situação de carência hídrica foi efectuado com o objectivo de averiguar se a resposta das plantas nestas duas situações apresentava características comuns ou se se manifestava de forma diferente. Foi também objectivo deste trabalho averiguar as principais alterações morfológicas e citológicas das células de folhas de plantas infectadas pelo *P. infestans*.

II- MATERIAL E MÉTODOS

1- Material Biológico – condições de crescimento e inoculação

As experiências foram realizadas em plantas da espécie *Solanum tuberosum* L., cv. Desirée. Os tubérculos de batateira foram colocados em quatro lotes de vasos contendo solo natural numa das estufas abertas do Jardim Botânico do Porto. Os vasos foram mantidos à temperatura ambiente e com um fotoperíodo ambiente.

Após a emergência das plantas (considera-se o dia de emergência de plantas o dia em que 50% das plantas emergiram) os 4 lotes de plantas foram sujeitos a diferentes tratamentos (Fig. 33). Assim, dezassete dias após a emergência (dae) sujeitaram-se os 4 lotes a dois tratamentos diferentes: as plantas dos lotes 1 e 2 foram regadas periodicamente enquanto que as plantas dos lotes 3 e 4 não foram regadas durante uma semana. Após esta semana, todos os lotes de plantas foram pulverizados abundantemente. As plantas do lote 1 e 3 foram pulverizadas com água enquanto que as plantas do lote 2 e 4 foram pulverizadas com uma solução contendo zoósporos do patógeno *Phytophthora infestans*.

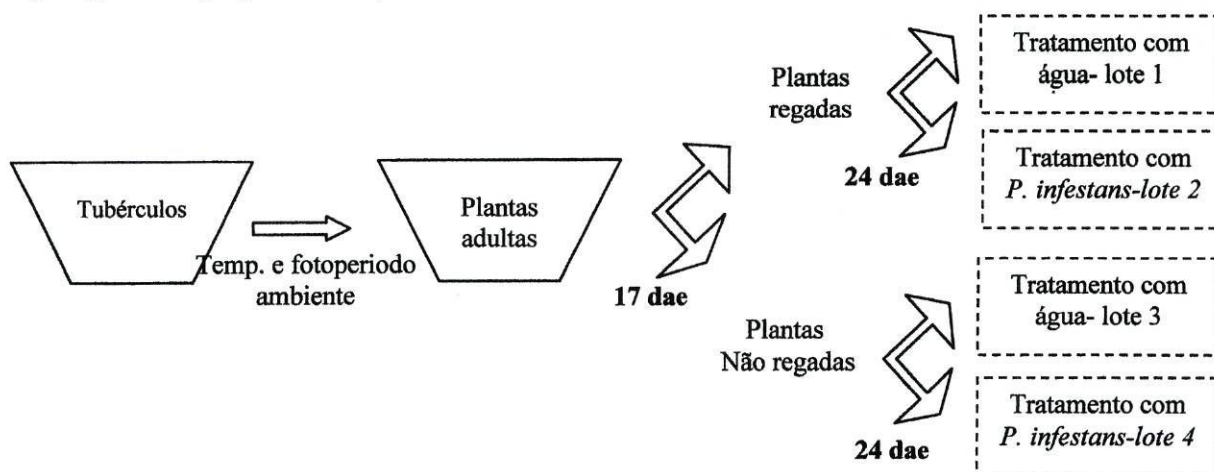


Fig. 33- Esquema dos tratamentos realizados nos 4 lotes de plantas.

O patógeno, *Phytophthora infestans*, foi cultivado em meio de agar suplementado com extracto de ervilha, com tempo de incubação de 5 dias, a 18°C e na obscuridade, de forma a induzir o crescimento e a esporulação deste patógeno. Os esporângios e micélio formados foram suspensos em água estéril. A suspensão de zoósporos foi feita de modo a ficar a uma concentração de aproximadamente $1,2 \times 10^4$ zoósporos por mL. O tratamento com o patógeno foi realizado, pulverizando as plantas dos lotes 2 e 4 com a solução de zoósporos do patógeno. A pulverização foi feita 24

dias após emergência e foi realizada de modo a que toda a planta ficasse bem pulverizada. As plantas controlo (lote 1 e 3) foram pulverizadas com o mesmo volume de água.

As colheitas do material foliar foram realizadas um dia e quatro dias após a pulverização. Dada a existência de ritmos biológicos nas plantas a colheita do material foliar foi sempre realizada à mesma hora, aproximadamente às 15h da tarde. Em cada colheita, para as quatro situações, procedeu-se à recolha da quarta folha, constituída por um folíolo terminal e o primeiro par de folíolos laterais, de todas as plantas. Após a colheita, o material foi convenientemente acondicionado em caixas com algodão humedecido até ao laboratório. Do total de folhas, para cada situação, formaram-se conjuntos com os folíolos terminais (de 12 a 14 plantas) e conjuntos com os folíolos laterais, que foram guardados em tubos de plásticos, congelados em azoto líquido e guardados em câmaras frigoríficas a -80°C . Posteriormente, e para os estudos efectuados neste trabalho, procedeu-se à maceração em azoto líquido do total de conjuntos de folíolos terminais, para cada situação. As amostras pulverizadas, resultantes das macerações, foram divididas em alíquotas e guardadas em tubos *ependorf* na câmara frigorífica a uma temperatura de -80°C . Desta forma, as amostras guardadas, são amostras bem representativas de cada situação dado serem o resultado de folhas retiradas de doze a catorze plantas de cada situação. Este material foi usado posteriormente para estudos de actividade da CAT, APX e SOD em geles nativos de poliacrilamida e para quantificações bioquímicas.

O estudo efectuado neste trabalho abrangeu plantas regadas não sujeitas à infecção com patogénio após um e quatro dias de tratamento e plantas regadas tratadas com patogénio após um e quatro dias de tratamento. Nas plantas sujeitas a *secura* efectuou-se também o estudo na presença e na ausência do patogénio após um dia de tratamento.

2- Extracção enzimática

2.1- Catalases

As amostras foliares foram homogeneizadas em almofarizes previamente arrefecidos, em banho de gelo, com areia de quartzo, PVP insolúvel a 2% e com 1 a 2 mL de meio de homogeneização. O meio de homogeneização apresentava a seguinte constituição: tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,3), com EDTA 1mM, PMSF 1

mM; cocktail enzimático (Complete, Mini, EDTA- free da ROCHE) preparado de acordo com as indicações do fornecedor, glicerol de forma a ficar com concentração final de 8% e ascorbato 7 mM. O homogeneizado foi centrifugado num rotor angular óptima a 17500 g (centrífuga OPTIMA™ Ultracentrífuga -Beckman), durante 18 minutos, a 4° C. Parte do sobrenadante recolhido foi, após junção com DTT (de forma a ficar 10mM), utilizado para quantificar proteínas e para guardar a - 80°C para gel (combinadas com glicerol de forma a ficar a 40%). O restante sobrenadante foi dialisado durante toda a noite, em mangas de diálise com um cutoff de 6000 a 8000 Da, contra tampão fosfato 60 mM (pH 7,3) com ascorbato 7 mM, com agitação, protegido da luz e a uma temperatura de 4°C. Após recolha do dialisado, as amostras foram novamente sujeitas a centrifugação num rotor angular óptima, a 17500 g durante 10 minutos, a 4 °C. Este sobrenadante, foi utilizado de imediato na quantificação de proteínas e na quantificação da actividade da enzima ao eléctrodo de oxigénio, sendo que para esta última quantificação o sobrenadante foi combinado com glicerol de forma a ficar a 40 %.

2.2- Superóxido dismutase

A extracção e a diálise decorreram de forma idêntica à descrita no ponto 2.1. Ao sobrenadante resultante da diálise, adicionou-se azida sódica (um inibidor das peroxidases), de forma a ficar com concentração final de 10 µM. Este sobrenadante foi utilizado directamente para quantificar proteínas e para determinar a actividade da enzima ao espectrofotómetro. A restante parte foi guardado para gel no frio (-80°C), com glicerol de forma a ficar a 10 %.

2.3- Peroxidases

A extracção e diálise decorreu de forma idêntica à descrita no ponto 2.1. Parte do sobrenadante obtido foi utilizado para quantificar proteínas. As amostras para gel e para quantificação da actividade da enzima ao espectrofotómetro foram guardadas no frio (em gelo) com glicerol (concentração final 40%), para utilização imediata nos respectivos procedimentos.

3- Actividade enzimática e polimorfismo em gel nativo de poliacrilamida

3.1- Actividade e polimorfismo da CAT

As electroforeses foram realizadas em gel vertical com 1.5mm de espessura, em unidades de electroforese SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments), com base no sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970) mas sem SDS. O gel para CAT é um gel nativo de poliacrilamida não desnaturante (a 7 % gel separador e 5 % o gel concentrador) com glicerol a 10 %. Para um volume final de 10 mL, o gel separador foi preparado da seguinte forma: 2,33 mL de acrilamida/bisacrilamida, 1,25 mL de tampão Tris HCl 1,5M (pH 8,8), 1,15 mL de glicerol 87%, 0,5 mL de solução APS 1,5% e 4,77 mL de água destilada. Esta mistura foi desgaseificada durante 5 minutos, após o que se adicionou 5 µL de TEMED. Para um volume final de 5 mL, o gel concentrador foi preparado da seguinte forma: 0,33 mL de acrilamida/bisacrilamida, 0,625 mL de tampão TrisHCl 0,5M (pH 6,8), 0,285 mL de glicerol a 87%, 0,25 mL de solução de APS 0,25% e 2,02 mL de água destilada e finalmente 12,5 µL de TEMED.

As amostras para gel, já combinadas com glicerol com concentração final de 40 % e DTT 10mM, foram combinadas com tampão de amostra (contendo 60 mM de DTT) na proporção de 10:1. O tampão de amostra para gel não desnaturante é composto por azul de bromofenol 0,1% (v/v) e sacarose a 50 % (p/v).

O tampão de electroforese é constituído por tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,3) com glicina 192mM. As electroforeses foram realizadas a uma voltagem fixa de 80 V e a uma temperatura de 4°C.

A actividade e polimorfismo da CAT foi detectada incubando o gel em água durante 45 minutos (tendo-se renovado a água de 15 em 15 minutos); posteriormente o gel foi incubado numa solução de H₂O₂ 3,27 mM durante 20 minutos, com agitação e na obscuridade. Seguidamente o gel foi lavado rapidamente em água antes de incubar numa solução de revelação (solução constituída por partes iguais de solução de cloreto ferrico 2% (p/v) e solução de ferricianeto III de potássio 2%) até as bandas surgirem num fundo escuro. A reacção foi parada passando o gel por água destilada.

3.1- Actividade e polimorfismo da SOD

As electroforeses foram realizadas em gel vertical com 1,5 mm de espessura, em unidades de electroforese SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments), segundo o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970) mas sem SDS. O gel para

detecção da actividade das diferentes isoformas SOD é um gel nativo de poliacrilamida não desnaturante (gel separador a 10% e gel concentrador a 5%) com glicerol a 10 %. O gel separador apresenta constituição semelhante ao gel para CAT (ver 3.1), no entanto, no gel separador a quantidade de acrilamida/bisacrilamida passou para 3,33 mL e a quantidade de água foi ajustada de forma a manter o volume final constante. O gel concentrador apresentou a mesma composição descrita anteriormente (ver ponto 3.1).

As amostras a aplicar guardadas com glicerol a 10% foram combinadas com tampão de amostra para gel não desnaturante (ver composição em 3.1) na proporção de 10:1.

A electroforese decorreu a 4°C, com uma amperagem fixa de 15 mA por gel em Tampão Tris- HCl 50mM (pH 8.3) com 192 mM de glicina.

No sentido de identificar as isoformas obtidas, as amostras foram aplicadas em triplicado para que após a electroforese, o gel pudesse ser cortado em três partes, sendo uma delas sujeita à actuação do inibidor KCN, que inibe as Cu/ZnSOD, e outra sujeita à actuação do H₂O₂, que inibe quer as Cu/ZnSOD quer as FeSOD. Após a electroforese o gel foi revelado com base no método fotoquímico de Beauchamp & Fridovich (1971). Todo o gel foi incubado em NBT a 2,5 mM durante 20 minutos. Posteriormente cortou-se o gel em três partes iguais tendo-se incubado cada uma delas em solução de desenvolvimento (tampão fosfato de potássio 36mM (pH 7,8), com TEMED a 28 mM e riboflavina a $2,8 \times 10^{-5}$ M) durante 20 minutos. A esta solução desenvolvimento foi adicionado, numa das porções do gel, H₂O₂ de forma a ficar com concentração final de 8 mM e, noutra porção, adicionou-se KCN de forma a ficar com concentração final de 2mM. Todos estes procedimentos foram realizados à temperatura ambiente, com agitação e na obscuridade. Seguidamente as três porções do gel foram lavadas, colocadas em água destilada e iluminadas com uma lâmpada de 60W colocada na vertical dos geles (a 20- 30 cm), até as bandas surgirem nos geles com o fundo escuro. A reacção foi parada com ácido acético 7,5%, onde o gel ficou guardado.

3.3- Actividade e polimorfismo da APX

As electroforeses foram realizadas em gel vertical com 1,5 mm de espessura, em unidades de electroforese SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments), com base no sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970) mas sem SDS. O gel para detecção da actividade das diferentes isoformas de APX, é um gel nativo de poliacrilamida não desnaturante (gel separador a 9% e gel concentrador a 5%) com

glicerol a 10 %. O gel separador apresenta constituição semelhante ao gel para CAT (ver 3.1), no entanto, a quantidade acrilamida/bisacrilamida passou para 2,5 mL e a quantidade de água foi ajustada de forma a manter o volume final constante. O gel concentrador apresenta a mesma composição descrita anteriormente (ver ponto 3.1).

As amostras para gel já combinadas com glicerol a 40 %, foram combinadas com tampão de amostra para gel não desnaturante na proporção de 10:1. Antes da aplicação das amostras no gel, foi feita uma electroforese prévia em tampão de Tris HCl 50 mM (pH 8,3), com 192 mM Glicina, e 2 mM ascorbato, durante 30 minutos, a 4°C e com uma corrente com intensidade fixa de 35 mA, para permitir que o ascorbato se incorpore no gel. As amostras foram aplicadas em duplicado de forma a que o gel pudesse ser cortado em duas partes. Após a aplicação das amostras, procedeu-se a separação electroforetica, diminuindo a intensidade da corrente eléctrica para os 15 mA e mantendo a temperatura. A revelação do gel foi realizada de forma a permitir a detecção da actividade da APX, segundo o método descrito por Mittler e Zilinskas (1993). O gel foi incubado em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), com 2 mM de ascorbato ao abrigo da luz e com agitação, durante 30 minutos (renovando a solução aos quinze minutos). Posteriormente o gel foi cortado e, no sentido de averiguar se as peroxidases detectadas eram efectivamente peroxidases do ascorbato, recorreu-se à inibição específica da actividade desta enzima utilizando o inibidor Fluoreto de hidroximetilsulfonilo (P-HMB). A porção não sujeita ao inibidor, foi incubada em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) com ascorbato 4 mM e 2 mM de H₂O₂ ao abrigo da luz e com agitação continua. Após 20 minutos, passou-se o gel por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) durante 1 minuto e finalmente o gel foi incubado em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), com TEMED 28mM, e NBT 2,45 mM durante alguns minutos até se visualizar as bandas claras num fundo escuro. A porção sujeita à actuação do inibidor, foi incubada numa solução contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), com 2 mM de ascorbato e 600µM de P-HMB, durante 25 minutos. Posteriormente foi pipetado para a solução anterior ascorbato de forma a ficar com concentração final de 4mM e H₂O₂ de forma a ficar com concentração final de 2 mM. Após 20 minutos, passou-se o gel por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) durante 1 minuto e finalmente incubou-se em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), com TEMED 28mM, e NBT 2,45 mM durante alguns minutos até se visualizar as bandas claras num fundo escuro. A reacção foi parada com água desionizada e o gel

guardado em ácido acético 10 %. Toda a revelação foi realizada no escuro e com agitação suave.

4- Actividade enzimática por métodos bioquímicos

4.1- Actividade da CAT ao Eléctrodo do Oxigénio

A actividade desta enzima foi quantificada numa câmara com volume final de 3mL que continha tampão fosfato 100mM (pH 7,0) a uma temperatura constante de 25°C, amostra (combinada com glicerol de forma a ficar a 40%) e peróxido de hidrogénio (com concentração final 20mM). O registo foi feito após a adição do H₂O₂, e durante um minuto. Foram feitos cálculos, de forma que os volumes de extractos colocados contivessem sempre, aproximadamente, o mesmo valor de proteína.

4.2- Actividade da SOD ao espectrofotómetro

A actividade da SOD foi determinada, espectrofotometricamente, com base no método descrito por *Flohé et al.* (1971), em que a taxa de redução do citocromo c por radicais superóxido é monitorizada a 550nm utilizando o sistema xantina/xantina – oxidase como fonte de radicais superóxido. A SOD vai competir pelo superóxido e diminuir a taxa de redução do citocromo c. O branco desta técnica foi obtido pela combinação de duas soluções A e B, cuja taxa de variação da absorvância deve ser aproximadamente de 0,025 UAbs/min. Esta taxa de variação consegue-se pela combinação de 2900 µL de solução A, com 50 µL de água e 50 µL de solução B. No entanto, se não se obtiver a variação desejada, diminui-se a quantidade de solução B e aumenta-se a quantidade de solução A até se atingir o valor pretendido. As quantidades de solução A e B são mantidas ao longo de todas as quantificações. A quantidade de extracto a aplicar foi calculada de forma a conter aproximadamente a mesma quantidade de proteínas em todos os ensaios. Se o volume a aplicar for inferior a 50 mL completa-se o volume com água destilada.

A solução A é constituída por xantina 0,5 mM e citocromo a 0,2mM em NaOH 1mM ao qual se adicionou um volume dez vezes superior de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) com EDTA 0,1mM. A solução A deve ser guardada no escuro e no frio e é estável durante 3 dias a 4° C (Flohé & Otting, 1984). A solução B é constituída por xantina oxidase, de forma a ficar com 0,2 USOD/mL em EDTA 0,1 mM (Flohé & Otting, 1984).

Uma unidade de SOD define-se como a quantidade de enzima que inibe em cerca de 50 % a taxa de redução do citocromo *c*, sob condições específicas (Flohé & Otting, 1984).

Estudos realizados neste laboratório permitiram verificar que as maiores diferenças de actividade da SOD se obtinham pela adição de uma menor quantidade de proteína, indicando que a sua actividade para elevadas concentrações de proteína poderia estar a ser subvalorizada, devido à incapacidade do sistema xantina-xantina oxidase em fornecer uma quantidade de substrato suficiente para a quantidade de enzima presente. No sentido de diminuir este factor de variabilidade, a quantidade de proteína utilizada em todas os ensaios foi baixa e aproximadamente igual em todos os ensaios.

4.3- Actividade da APX ao espectrofotómetro

A actividade da APX foi determinada espectrofotometricamente através da taxa de oxidação do ascorbato por esta enzima, segundo o método descrito por *Amako et al.* (1994). Numa cuvete foi colocada uma mistura de reacção que continham num volume total de 1mL tampão fosfato de potássio 100mM (pH 7,3), ascorbato de forma a ficar com concentração final de 0,5mM, extracto (já combinado com glicerol de forma que a concentração final fique a 40%), água para completar volume e solução de H₂O₂ de forma a ficar a 0,1mM para iniciar a reacção. Quando o volume de extracto foi alterado, o volume de água foi ajustado de forma a manter o volume final. O volume de extracto a colocar foi calculado de forma a conter aproximadamente sempre a mesma quantidade de proteína em todos os ensaios.

As variações de absorvância foram lidas a 300 nm e registadas no espectrofotómetro. O coeficiente de extinção molar é $\epsilon = 0,49\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

4.4- Actividade da GPX ao espectrofotómetro

A actividade das GPX foi determinada pela taxa de oxidação do guaiacol. Esta oxidação foi monitorizada através do aumento de absorvância a 430 nm, com um coeficiente de extinção molar $\epsilon = 26,6\text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Para detectar a actividade das GPX dependentes do guaiacol, colocou-se numa cuvete de 1 mL tampão fosfato- potássio com concentração final 50 mM (a 25°C), guaiacol com concentração final de 20 mM, água para completar volume, extracto (com glicerol de forma a ficar a 40%) e inibidor das APX, o P- HMB, com concentração final de 50 μM . O volume de extracto a colocar

foi calculado de forma a conter aproximadamente a mesma quantidade de proteína em todos os ensaios. Após a colocação do inibidor, este ficou a actuar na obscuridade durante dez minutos, após os quais se iniciou a reacção juntando H_2O_2 de forma a ficar 0,2 mM.

Os resultados obtidos durante o estudo bioquímico da actividade das enzimas, são apresentados em “Resultados e Discussão” como médias de duas amostras independentes e de três ensaios para cada amostra. Os valores apresentados indicam a média mais ou menos o desvio padrão.

5- Quantificação de proteínas

Após a realização de uma diluição adequada a quantificação de proteínas foi realizada de acordo com método descrito por Peterson (1977). Em tubos de ensaio, com 0,5 mL de amostra convenientemente diluída, foi adicionado 0,5 mL de solução A. Após 10 minutos juntou-se 0,25 mL de solução B e esperou-se 20 minutos.

A absorvância foi lida a 750nm usando uma recta padrão obtida com concentrações conhecidas de BSA. A experiência foi realizada à temperatura ambiente.

A solução A preparou-se misturando volumes iguais de uma solução constituída por carbonato de sódio anidro 10 %, tartarato de potássio 0,2 % e sulfato de cobre pentahidratado 0.1 % (solução CTC), NaOH 0,8 M, SDS 10% e água desionizada. A solução B foi preparada adicionando a um volume de reagente de Folin-Ciocalteus, cinco volumes de água.

Quando os valores de proteína obtidos não permitiam a sua aplicação em gel, as amostras foram concentradas em tubos Amicon (Amicon, Bioseparations- Centricon YM-10), numa centrifuga com rotor Sorval, a 4000 g, durante 45 minutos, a 4°C.

6- Extracção de proteínas solúveis

As amostras foliares foram homogeneizadas em almofarizes previamente arrefecidos em banho de gelo, com areia de quartzo e PVP insolúvel a 2%, em 1 a 2 mL de meio de homogeneização. O meio de homogeneização foi constituído por Tampão Tris HCl 0,06M (pH 7,0), PMSF 1 mM, cocktail enzimático (Complete, Mini, EDTA-free, Roche) e ascorbato com concentração final 5mM. Os homogeneizados foram sujeitos a centrifugação num rotor angular óptima, a 17500 g, durante 18 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi directamente utilizado na quantificação proteica e, a outra

parte foi guardado em *ependorfs* com tampão de amostra para gel desnaturante [tampão Tris HCl 0,1875 M, pH 6,8, SDS 6% (p/v), β -mercaptoetanol 15% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (v/v) e glicerol a 30% (v/v)] na proporção 1 amostra/0,5 tampão de amostra. Estes *ependorfs* foram depois furados na tampa e foram colocados em banho-maria a 92°C, durante 5 minutos. Depois de arrefecidos, os *ependorfs* foram guardados em câmara frigorífica a -20°C.

7- SDS-PAGE- electroforese em gel desnaturante

As electroforeses foram realizadas em gel desnaturante de poliacrilamida (gel separador 12,5%, gel concentrador 5%), em unidades de electroforese SE 280 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments), segundo o sistema descontínuo descrito por Laemmli (1970). Para um volume final de 15 mL, o gel separador foi preparado adicionando 6,25 mL acrilamida/bisacrilamida, 3,8 mL de tampão Tris HCl 1,5M (pH 8,8), 150 μ L de SDS a 10% e 150 μ L de APS a 10 %. Após desgasificação durante 5 minutos, foi adicionado 6,0 μ L de TEMED. O gel concentrador foi constituído por 0,67 mL de acrilamida/bisacrilamida, 1,0 mL de tampão Tris HCl 0,5M (pH 6,8), 40 μ L de SDS a 10% e 40 μ L de APS a 10%. No fim foi adicionado 1,0 μ L de TEMED.

A aplicação de amostras no gel, foi feita de forma a permitir a aplicação de 10 μ g de proteínas no gel para coloração com nitrato de prata e 20 μ g de proteínas no gel para coloração com azul de Comassie. No primeiro poço do gel aplicou-se um marcador de proteínas de baixo peso molecular (14,4 e 92,5 kDa – BIORAD). A electroforese decorreu à temperatura ambiente, com uma amperagem fixa de 15 mA até as amostras atingirem o gel separador e depois com amperagem de 20 mA. A composição do tampão de electroforese foi a seguinte: tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3), com 0,192 M de glicina e SDS 0,1%.

A revelação do gel foi feita utilizando duas técnicas distintas. A Técnica de coloração com azul de Comassie realizou-se incubando o gel em corante (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,125% (p/v), metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)) durante 45 minutos e posteriormente incubando o gel numa solução descolorante (7% ácido acético (v/v) e 5 % metanol (v/v)) até surgirem bandas azuis num fundo transparente. A Técnica de coloração com nitrato de prata foi executada incubando o gel por solução com 30% etanol e 10% de ácido acético (2.30h ou durante a noite). Posteriormente o gel foi incubado em solução com 20% etanol. Após 10 minutos, o gel foi transferido para água durante mais 10 minutos. Seguidamente passou-se o gel por

uma solução de tiosulfato de sódio 0,02%. Após um minuto o gel foi lavado em água desionizada (fazer duas lavagens de 20 segundos cada) e incubado numa solução de nitrato de prata 0,2% durante 30 minutos. Após lavagem do gel com água (fazer três lavagens de 15 segundos cada), este foi a incubar em solução de desenvolvimento durante alguns minutos até surgirem as bandas escuras num fundo claro. A solução de desenvolvimento é constituída por carbonato de sódio 30 g/L, em tiosulfato de sódio 10 mg/L e formaldeído 0,7 mL/L. A reacção foi parada com uma solução constituída por Tris base (50g/L) e ácido acético 2,5%. O gel ficou guardado em água.

8- Peroxidação lipídica

A extensão da peroxidação lipídica foi determinada avaliando a quantidade de malondialdeído (MDA) formado, por peso fresco (Wang *et al.*, 1999). As amostras foliares após terem sido homogeneizadas em azoto líquido foram divididas em alíquotas (quatro para cada situação em estudo). Cada amostra (50 mg), foi colocada a reagir com 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 5% e 50 µL de hidroxitolueno butilato (BHT) 2% em etanol, tendo sido posteriormente colocado em banho-maria, durante trinta minutos a uma temperatura de 92°C. Seguidamente procedeu-se à centrifugação das amostras durante 20 minutos, a 11750 g. Do sobrenadante obtido, retirou-se 500 µL ao qual se adicionou 500 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,67% em NaOH 50mM. Colocou-se em novo banho-maria, durante 30 minutos, a uma temperatura de 92°C. Após arrefecimento, foram realizadas as leituras de absorvância para os valores de comprimento de onda de 532 e 600nm. A concentração de malondialdeído, foi obtida através da diferença entre os dois valores de absorvância, sabendo que o coeficiente de extinção molar é $\epsilon=155 \text{ Mm}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Quando a amostra não foi suficiente para perfazer os 50 mg ou excedeu esse valor, todos os reagentes foram ajustados de forma a manter entre eles a proporção referida anteriormente.

9- Preparação de folhas para microscopia óptica e electrónica

Os blocos com porções de folhas relativas às situações de plantas não sujeitas a carência hídrica, não infectadas e infectadas com o patogénio *P. infestans* quatro dias após tratamento foram fornecidos pelo laboratório.

Os cortes semi-finos para **microscopia óptica** foram realizados num ultramicrotomo (LKB Bromma 8800 ultrotome ® III) utilizando uma faca de vidro. Os cortes foram realizados de forma a atravessar transversalmente a folha. Estes cortes,

foram posteriormente corados passando por uma solução, constituída por partes iguais de Solução Azure a 1 % e Solução azul-de-metileno a 1 % em Borax a 1 %. Posteriormente os cortes foram passados por água (destilada e filtrada). A fixação dos cortes na lâmina foi feita utilizando epon. As observações foram feitas num microscópio óptico modelo Nikon Biophot. Todas as fotografias foram tiradas utilizando um filme 100 asa.

Os cortes ultra-finos para **microscopia electrónica** foram realizados no mesmo micrótono referido anteriormente mas utilizando faca de diamante, sendo os cortes recolhidos grelhas de cobre. Os cortes das grelhas foram posteriormente contrastados passando as grelhas por solução de acetato de uranilo 0,5% (solução aquosa) durante sete minutos e seguidamente por uma solução de citrato de chumbo denominada de solução de Reynold's durante sete minutos. Para finalizar as grelhas foram passadas por água desionizada e filtrada. A fim de evitar a evaporação das soluções contrastantes e a contaminação por poeiras, fez-se este tratamento dentro de placas de *Petri* tapadas, cujo fundo se recobriu com cera de dentista que, pela sua hidrofobicidade, tende a evitar que as gotas das soluções contrastantes alastrem (Salema & Santos, 1992). Dentro das placas de *Petri*, colocou-se um vidro de relógio contendo pastilhas de NaOH que absorve o CO₂ atmosférico e assim evita a alteração da solução de Reynold's (Salema R. & Santos, 1992). As observações foram realizadas num microscópio electrónico modelo Siemens Elmiskop.

10- Análise densitométrica dos geles

Para analisar a intensidade das bandas do gel, foi utilizado o programa Image Quant ® 5,1 (Molecular Dynamics®). Neste programa, após a delimitação de uma área contendo uma ou mais bandas, o computador fez a leitura de intensidade de luz lida acima do fundo do gel.

11- Análise estatística da actividade enzimática

A análise estatística foi realizada usando o teste *t* de Student.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas das plantas quando estão sujeitas a stresse, são muitas vezes um dos primeiros locais a serem visivelmente afectados. Relativamente à secura é frequente ocorrer o encurrilhar das folhas bem como uma clorose acentuada. Já relativamente à infecção com patógenos, a resposta mais visível nas folhas é o aparecimento de manchas negras espalhadas pelas folhas, as manchas necróticas.

No nosso trabalho, as plantas após estarem sujeitas a situação de secura durante uma semana, e no sentido de avaliar se estavam realmente sob este stresse, foi realizada a determinação do teor de água relativo (TAR) das células. Nas plantas sujeitas a uma situação de não carência hídrica, obteve-se um TAR de 90,79% e nas plantas sujeitas a uma situação de carência hídrica obteve-se um TAR de 77,35%. Estes valores mostram que, de facto, a situação hídrica das plantas é bastante diferente, sendo o valor obtido nas plantas sujeitas a secura, considerado de situação de moderada secura (Rey *et al.*, 1998). Após a infecção de folhas de batateira pelo *P. infestans*, os sintomas apresentados pelas folhas das plantas em diferentes regimes hídricos foram diferentes na sua intensidade.

Após um dia de infecção (não mostrado) apesar de ter ocorrido o aparecimento de manchas necróticas e de clorose nas duas situações, as folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica foram demarcadamente mais afectadas pelo tratamento com o patógeno do que as folhas das plantas que sofreram carência hídrica seguido de tratamento com o patógeno. Após quatro dias de pulverização com o patógeno, o aspecto geral das folhas de plantas sujeitas a situação de não stresse hídrico e a situação de carência hídrica encontra-se ilustrado na fig. 34. Foi bem notória a presença de manchas necróticas causadas pela infecção das folhas, quer em plantas regadas de forma a não apresentarem carência hídrica, quer nas plantas sujeitas à falta de água. De notar que, paralelamente ao verificado para um dia, foi evidente o maior grau de senescência, que as folhas apenas sujeitas ao stresse provocado pelo patógeno apresentaram (fig. 34 B). De uma maneira geral, apresentaram uma clorose mais acentuada do que as folhas sujeitas também à falta de água, que parecem ter sido menos degradadas (fig. 34 C).



Fig. 34- Aspecto das folhas quatro dias após tratamento. A- folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica e não infectadas com *P. infestans*; B- folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica e infectadas com *P. infestans*; C- folhas de plantas sujeitas a carência hídrica e infectadas com *P. infestans*.

As folhas de plantas sujeitas ao stresse hídrico apresentaram menor grau de alteração levando a admitir estarem dotadas de maior capacidade de resistência à infecção pelo patogénio do que as plantas não sujeitas a carência hídrica. Este tipo de comportamento em que a exposição a um determinado stresse permitiu uma melhor adaptação da planta a um stresse posterior, foi já descrita para algumas plantas sujeitas a determinados stresses por Bowler *et al.* (1992). Este fenómeno denominado por tolerância cruzada (Pastori & Foyer, 2002) acontece quando as vias e/ou componentes de resposta da planta são comuns a ambos os stresses. Na situação estudada a resposta comum a estes dois stresses parece ser o aumento da produção de EROs, embora o início da sua produção ocorra em locais diferentes da célula. Estas observações levaram a admitir que possivelmente perante o primeiro stresse e o primeiro aumento da produção de EROs, a planta desencadeou os mecanismos de resposta adequados, nomeadamente a síntese de enzimas antioxidantes para remover as EROs formadas. Aquando do segundo stresse e do segundo aumento de actividade das EROs, a planta, como já havia desencadeado o aumento de actividade de enzimas antioxidantes, estaria assim com as suas defesas reforçadas e por isso melhor preparada para fazer face a este segundo stresse. Assim, parece possível admitir a existência de uma tolerância cruzada específica desta espécie, em que a exposição ao stresse provocado por carência hídrica protegeu a planta do stresse imposto pelo tratamento com o patogénio.

Sabendo-se da literatura que após a penetração de um patógeno de raça incompatível, em folha de batateira, ocorre um disparo oxidativo (Chai & Doke, 1987), realizou-se o estudo de algumas defesas enzimáticas antioxidantes das células como SOD, CAT, APX, GPX, nas plantas estudadas. Fez-se também a avaliação do nível de peroxidação lipídica, como meio de avaliar o grau de stresse das plantas e realizou-se o estudo das proteínas solúveis presentes nas folhas de plantas que sofreram estes tratamentos.

1- ACTIVIDADE E POLIMORFISMO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

Diversos estudos realizados têm permitido verificar que a actividade e o número de isoformas da SOD se altera na presença de algumas situações de stresse como o ataque de patógenos ou a secura. Trabalhos realizados em folhas de batateira por Santos *et al.*, (1999), demonstraram que em situação de stresse, provocado pela radiação UV-B, ocorria um aumento de actividade desta enzima, e uma alteração do padrão isoenzimático com o aparecimento de uma nova isoforma e o desaparecimento de outra. Estudos realizados por Bowler e colaboradores (1992) em tomateiros, indicaram que em situações de secura, ocorria forte indução de uma isoforma Cu/ZnSOD citosólica, enquanto que outra isoforma Cu/ZnSOD permanecia inalterada. A indução de novas isoformas de Cu/ZnSOD também foi observada em folhas de ervilheira por Pastori *et al.* (1997).

Os resultados obtidos no nosso trabalho mostraram que, em plantas regadas, a infecção com o patógeno não causava alteração significativa na actividade total da SOD, após um dia de infecção. Comportamento diferente foi observado após quatro dias de inoculação tendo-se quantificado um aumento de actividade desta enzima. Nas plantas sujeitas a carência hídrica, o tratamento com o patógeno não provocou alteração significativa da actividade da SOD (tabela 6 e gráfico 1). Também se encontrou um valor de SOD, nas plantas sujeitas a stresse hídrico significativamente superior ao valor quantificado nas plantas hidratadas após, um dia de tratamento.

Tabela 6 – Actividade específica da SOD expressa em Unidades de SOD/ mg proteína.

	Controlo (U/mg proteína)	Patogénio (U/mg proteína)	Resultado do teste <i>t</i>	Varição de actividade do controlo para o patogénio em %
rega 1 dia	20,8 ± 0,6531	21,5 ± 0,1400	não significativamente diferente	—
rega 4 dias	18,3 ± 0,3466	29,5 ± 0,2627	significativamente diferente	+ 61 %
secura 1 dia	23,8 ± 0,8100	24,9 ± 0,4981	não significativamente diferente	—

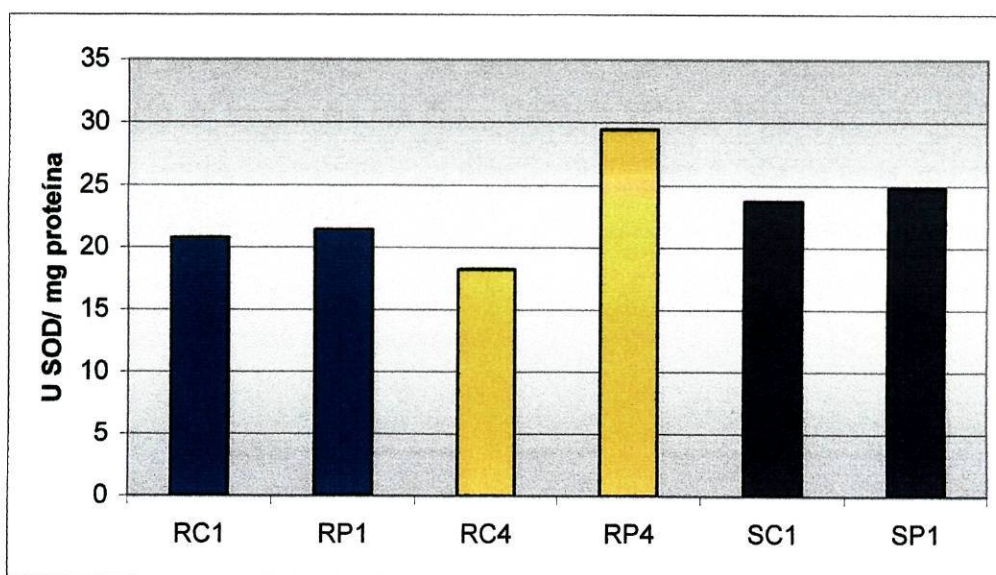


Gráfico 1 – Representação gráfica dos valores de actividade de SOD expressos em U SOD/mg proteína. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; RC4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

Os resultados obtidos em gel permitiram detectar em plantas regadas seis isoformas de SOD que face ao seu comportamento na presença dos inibidores Cianeto e Peróxido de Hidrogénio, foram identificadas como sendo todas Cu/ZnSODs à excepção

da SOD-1 que foi por nós interpretada como sendo o resultado de uma co-migração de uma Cu/ZnSOD e de uma FeSOD, dado a sua actividade não ter sido inibida na totalidade na presença de cianeto (fig. 35 A-II). Estes resultados estão de acordo os obtidos em folhas de batateira por Santos *et al.* (1999), que demonstram em situações controlo, a existência de cinco isoformas mas neste caso eram três de Cu/ZnSOD e duas isoformas de FeSOD. Nestas plantas o tratamento com o patogénio não alterou o número de isoformas de SOD (fig. 35 A e A'), nem alterou a intensidade de bandas após um dia de infecção, (tabela 6; gráfico 1 e 2). Este resultado é concordante com a quantificação bioquímica da actividade da SOD.

Trabalhos realizados por Martinez *et al.* (2001), em que sujeitaram *S. tuberosum* (espécie sensível ao frio) a tratamentos com metilviolagénio e à falta de água, identificaram na situação controlo seis isoenzimas sendo uma MnSOD, quatro Cu/ZnSOD e uma FeSOD. Nas plantas tratadas com metilviolagénio, verificou-se uma diminuição da actividade total desta enzima. De salientar que no nosso material não foi visualizada nenhuma MnSOD. A não detecção deste tipo de SOD pode ser resultante de a quantidade desta isoforma não ser suficiente para ser visualizada no gel ou da ausência de expressão desta isoforma neste órgão e nesta situação.

Nas plantas regadas mas após quatro dias de tratamento, verificou-se um padrão de isoformas diferente do observado no material colhido um dia após tratamento. No material não sujeito à infecção e sujeito a infecção surgiram duas novas isoformas que, de acordo com o seu comportamento com os inibidores, foram identificadas como sendo FeSOD (SOD 1a) e Cu/ZnSOD (SOD 4a) (fig. 35 B e B'). O aparecimento destas isoformas apenas após quatro dias parece ser uma consequência do estado de desenvolvimento do planta. Nas plantas sujeitas ao tratamento com o patogénio verificou-se um aumento de actividade total da SOD em cerca de 61 % (tabela 6), no entanto, verificou-se uma diminuição da actividade da isoforma SOD 1a (fig. 35 B'). A presença de uma FeSOD pode ser indicativo de um maior stresse oxidativo nos cloroplastos, tendo esta enzima a função de aumentar a protecção do PS II de possíveis danos. O aumento geral da actividade desta enzima poderá ser o resultado da alteração de vários processos fisiológicos, por exemplo, a activação de NADP oxidases da membrana celular cuja activação já se verificou ocorrer após o reconhecimento de um eliciador pela célula do hospedeiro.

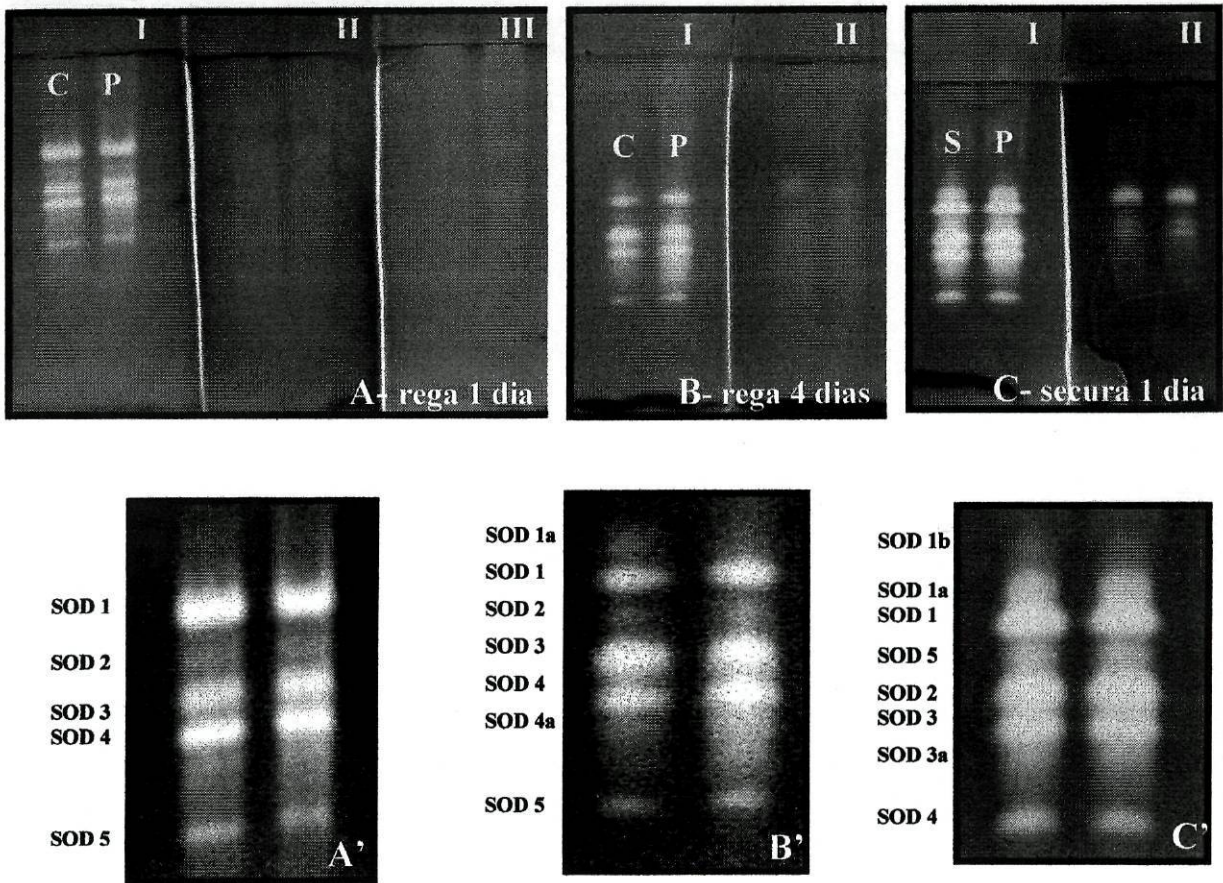


Fig. 35- Detecção da actividade das isoformas de SOD em gel nativo com 60 μg de proteínas. A- situação de não carência hídrica após 1 dia de tratamento. B- situação de não carência hídrica 4 dias após tratamento. C- situação de secura 1 dia após tratamento. A', B' e C' correspondem a ampliação da porção não sujeita a inibidores do gel A, B e C respectivamente. C- isoformas em folhas de plantas não sujeitas à infecção com patogénio; P- isoformas em folhas inoculadas com *P. infestans*; S- isoformas em folhas sujeitas a secura; I- gel sem inibidores; II- gel com o inibidor KCN; III- gel com o inibidor H_2O_2 (não mostrado no gel B e C dado ter evidenciado mesmo comportamento que no gel A). De acordo com sensibilidade aos inibidores SOD6- FeSOD; SOD1- Cu/ZnSOD + FeSOD e as restantes são Cu/ZnSOD. A migração representada é anodal.

No material foliar de plantas sujeitas a carência hídrica verificou-se para além das sete isoenzimas descritas anteriormente, o aparecimento de mais uma isoforma na situação controlo e na situação de infecção (SOD 1b, com baixa mobilidade) que, de acordo com o comportamento na presença dos inibidores, parece ser uma Cu/ZnSOD. O facto de as bandas referenciadas por SOD 2 e SOD 3 não terem desaparecido do gel inibidor parece indicar o aparecimento de FeSOD com a mesma mobilidade que a SOD 2 e SOD 3. Comparativamente com as situações anteriores, parece haver um aumento

da actividade de todas as isoformas desta enzima quer na ausência quer na presença do patogénio, aumento esse que está bem patente no gel (fig. 35 C e C'). O aumento quer de actividade, quer do número de novas isoformas de enzimas antioxidantes constitui um sinal indicativo de que estes stresses causam um aumento do stresse oxidativo na célula, sendo portanto imperativo que seja activado um sistema anti-oxidante para reduzir os efeitos negativos que resultam da acumulação de EROs.

Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos por Perl-Treves & Galun (1994). Estudos já realizados por Scandalios *et al.* (1993), referem que em situações de secura ou ataque de patogénios, as plantas respondem com um aumento dos níveis da SOD. Este aumento de actividade da SOD pode ser o reflexo de um aumento de redução da cadeia de electrões dos cloroplastos, uma vez que, em condições de secura, ocorre frequentemente o fecho dos estomas com conseqüente menor entrada de CO₂, criando-se assim as condições que levam à formação de radicais superóxido, sendo necessário um aumento da actividade da SOD para que este radical seja eliminado. O facto de as plantas sujeitas a carência hídrica possuírem um nível mais elevado de SOD comparativamente com plantas não sujeita à falta de água, mostra que a batateira responde à secura com um aumento desta enzima. Possivelmente no material infectado não ocorreu um aumento significativo da SOD porque as plantas já possuiriam um nível elevado desta enzima.

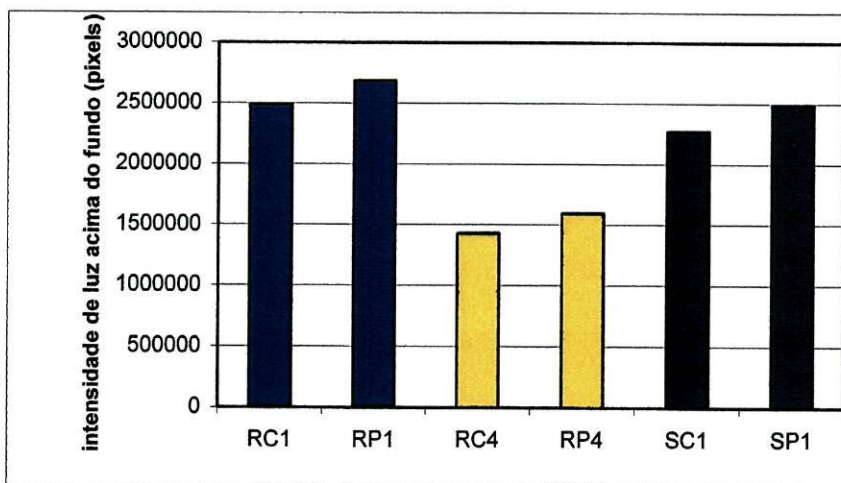


Gráfico 2 – Quantificação da intensidade de luz das bandas em gel. O valor obtido corresponde à intensidade de luz obtida acima do fundo que o aparelho regista. A quantificação foi feita nas pistas carregadas com 60 µg de proteínas. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; RC4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento

com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

2- ACTIVIDADE E POLIMORFISMO DA CATALASE

Numa situação de stresse como é o caso do ataque por patogénio ou a secura, uma das respostas mais rápidas é a produção de EROs. Estas moléculas, como já foi referido, quando em grandes quantidades, podem interferir em alguns processos metabólicos e causar danos na célula pelo que, têm de ser rapidamente removidas. Sabendo que a CAT é uma das enzimas responsáveis pela remoção do peróxido de hidrogénio, seria de esperar um aumento significativo da actividade dessas enzimas nas situações de stresse.

Os resultados obtidos mostraram que em plantas não sujeitas a carência hídrica, a infecção com o patogénio causou um aumento da actividade da CAT, após um dia de infecção. Comportamento diferente foi observado após quatro dias de inoculação tendo-se quantificado uma diminuição da actividade desta enzima. Estes resultados de actividade obtidos por espectrofotometria foram concordantes com os resultados obtidos em gel e estes por sua vez foram concordantes com os resultados obtidos pela análise densitométrica da actividade detectada nos geles (Tabela 7, Graf. 3 e 4 e Fig. 36).

Tabela 7 – Actividade da CAT expressa em μmol de oxigénio por minuto por mg de proteína.

	Controlo (μmol $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	Patogénio (μmol $\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	Resultado do teste <i>t</i>	Varição de actividade do controlo para o patogénio em %
rega 1 dia	5,4 \pm 0,1033	8,1 \pm 0,1715	Significativamente diferentes	+ 50,4%
rega 4 dias	101,7 \pm 2,8353	88,7 \pm 2,0000	Significativamente diferentes	- 12,7%
secura 1 dia	181,8 \pm 10,0944	163,6 \pm 8,4816	Significativamente diferentes	- 10,0 %

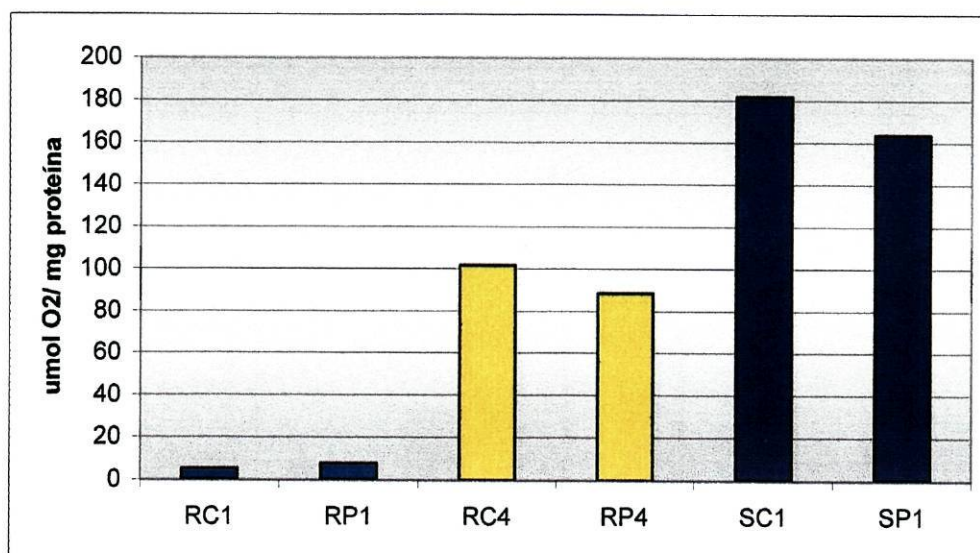


Gráfico 3 – Representação gráfica dos valores de actividade da CAT expressos em μmol oxigénio por minuto por mg de proteína. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; RC4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

Nas plantas sujeitas a carência hídrica, o tratamento com o patogénio levou a uma diminuição da actividade desta enzima. De notar que a actividade total desta enzima é nitidamente superior nas plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após pulverização e nas plantas sujeitas a secura quando comparando com a situação de plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após pulverização (gráfico 3). A baixa actividade registada ao eléctrodo de oxigénio para plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento, pode ter resultado da colocação de uma quantidade excessiva de proteína no extracto aplicado o que poderá ter subvalorizado os valores reais de actividade da enzima. Este factor de variação foi controlado colocando quantidades de extracto que contivessem pouca proteína mas aproximadamente a mesma quantidade em cada ensaio.

Os resultados obtidos em gel, levam-nos a considerar a existência de duas isoenzimas de CAT em folha de batateira, a CAT-1 e CAT-2 (fig. 36). Nas plantas sujeitas a uma situação de não carência hídrica, verificou-se a presença das duas isoformas de CAT. No entanto, na presença do patogénio, verificou-se um aumento acentuado das duas isoformas (mais de 50,4% de actividade) após um dia de tratamento.

Após quatro dias de inoculação, verificou-se uma diminuição da actividade total da CAT (cerca de menos 13%) embora, essa diminuição, fosse mais acentuada para a CAT-2 (fig. 36 B). Esta diminuição de actividade está de acordo com trabalhos realizados por Moran *et al.* (1994) e por Bartoz (1997).

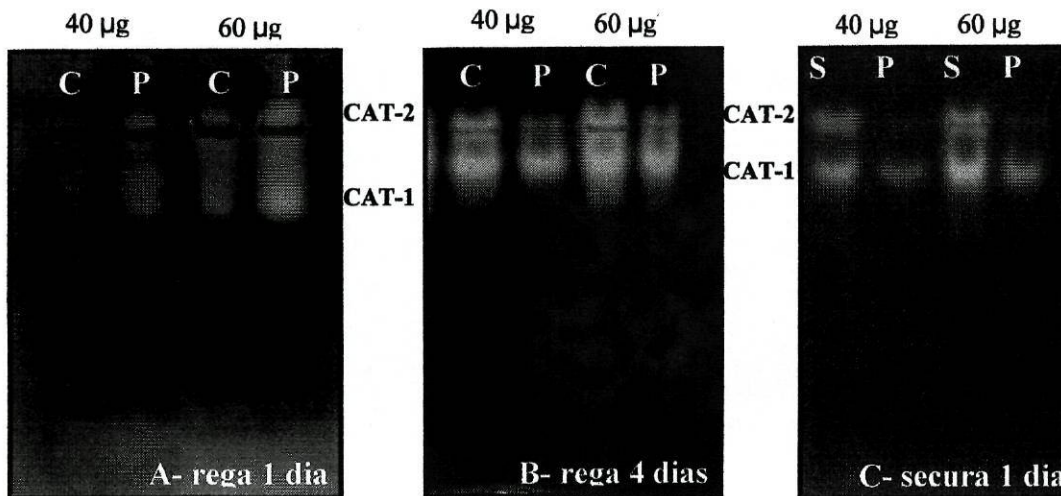


Fig. 36 – Detecção de actividade das isoformas de CAT em gel nativo com 40 e 60 µg de proteína. A- situação de não carência hídrica após 1 dia de tratamento; B- situação de não carência hídrica 4 dias após tratamento; C- situação de secura 1 dia após tratamento. Pista C – isoformas situação de não carência hídrica e sem infecção; Pista P – isoformas em situação de infecção pelo *P. infestans*; Pista S- isoformas situação de carência hídrica e sem infecção. A migração representada é anodal.

Nas plantas sujeitas a secura, um dia após a inoculação, verificou-se um comportamento semelhante ao observado em plantas regadas, quatro dias após tratamento com patogénio. Verificou-se que a presença do patogénio levou a uma diminuição de actividade da CAT (na ordem dos 10%). A observação em gel indica que essa diminuição é devido essencialmente à diminuição da isoforma CAT-2. Verificou-se também uma diminuição da actividade da CAT-1 embora de forma menos acentuada (fig. 36 C). Na situação de não infecção com patogénio nas plantas não regadas, verificou-se a presença de duas bandas muito mais intensas (fig. 36 C) quando comparadas com as bandas obtidas na situação em que as plantas não foram sujeitas a carência hídrica nem à infecção após um dia de tratamento (fig. 36 A). Esta diferença de intensidades indica que a secura levou a que a planta produzisse mais catalase activa, tendo sido predominante o aumento da CAT-2.

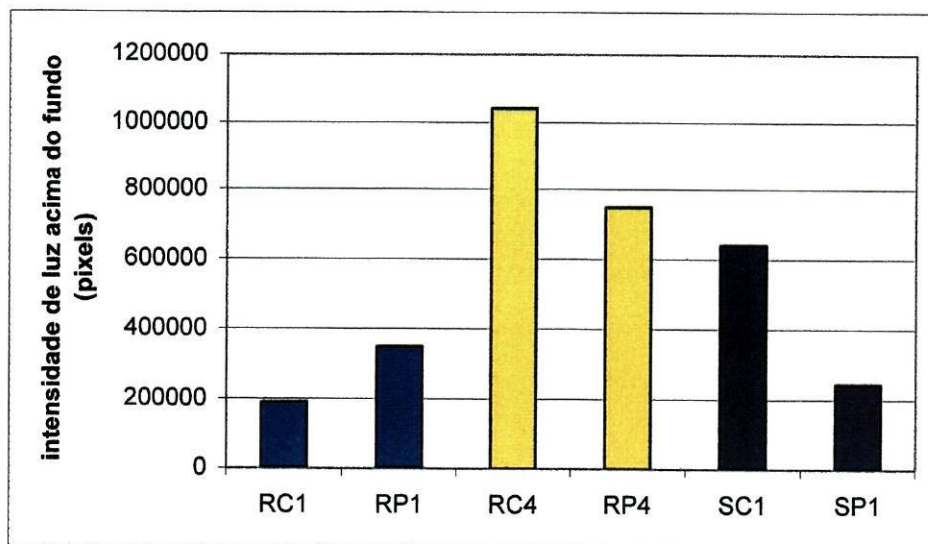


Gráfico 4- Quantificação da intensidade das bandas em gel. O valor obtido corresponde à intensidade de luz obtida acima do fundo que o aparelho regista. A quantificação foi feita nas pistas correspondentes a aplicação de 60 µg de proteína. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; RC4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

Os resultados obtidos demonstram comportamentos diferentes desta enzima perante dois tipos de stresses. Efectivamente, verificou-se um aumento de actividade da enzima nas plantas sujeitas a falta de água, no entanto, a presença do patogénio levou a comportamentos diferentes nas diferentes situações estudadas. Nas plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após infecção com patogénio ocorreu um aumento da actividade da CAT. Este aumento da CAT pode ser interpretado como uma resposta geral ao stresse provocado pela pulverização e não como uma resposta específica ao stresse provocado pelo patogénio. Nas plantas sujeitas à falta de água e nas plantas não sujeitas a stresse hídrico após quatro dias de tratamento verificou-se uma diminuição da actividade da CAT. Esta diminuição está de acordo com resultados obtidos por outros investigadores (Chen *et al.*, 1993; Scandalios, 1997), que referem que, a diminuição da actividade da CAT durante as interacções incompatíveis com patogénios, é o resultado da produção de ácido salicílico nas células que vai inibir a actividade da CAT, e assim, permitir um aumento dos níveis de H₂O₂ na célula. Este aumento de peróxido de

hidrogénio é importante na resposta da defesa da planta à infecção causada por um patogénio, uma vez que estas moléculas, são moléculas sinal importantes em muitas respostas de defesas das plantas nomeadamente no desencadear da Resposta de Hipersensibilidade que permitirá limitar a infecção a apenas algumas células das folhas. Por outro lado, a diminuição de actividade da CAT na presença do patogénio, pode ser devido ao facto de, nestas situações, as folhas das plantas apresentarem um estado de senescência mais avançado o que pode acarretar uma diminuição do teor em proteínas, que se vão deteriorando paralelamente à senescência da planta. Segundo Pastori & Del Rio (1994), esta enzima em condições de senescência, parece ser menos resistente quando comparada com a SOD ou a APX.

A técnica utilizada na revelação de gel, gerou por vezes algumas dúvidas na identificação do número de isoenzimas presentes. A banda identificada como CAT-2 parecia, em alguns geles, subdividir-se em duas. No entanto, estudos posteriores ao nosso trabalho realizados no nosso laboratório, em que foi detectada a actividade da CAT por outro método (HRP/DAB- horse radish peroxidase/ diaminobenzidina), demonstrou que, a banda escura que surge ao nível da CAT-2 é constituída por proteínas, e que naquela zona surge apenas uma única isoforma.

3- ACTIVIDADE E POLIMORFISMO DE PEROXIDASES

3.1 –Peroxidases do ascorbato

As APX são enzimas que têm um papel importante no metabolismo do H_2O_2 nas plantas superiores e, em combinação, com o ciclo ascorbato- glutathiona funciona no sentido de prevenir a acumulação de níveis tóxicos de H_2O_2 .

No nosso estudo, os valores encontrados para a actividade da APX mostraram que o stresse oxidativo imposto pelo patogénio causou uma resposta inicial de aumento, no entanto, após um período mais longo (quatro dias) de contacto com o agente infeccioso, ocorreu uma diminuição da actividade (tabela 8; gráfico 5: fig., 37). Nas plantas sujeitas à falta de água, a presença do patogénio não alterou a actividade total da enzima. Os valores de actividade da APX mais elevados, foram registados em plantas crescidas em situação de não carência hídrica após quatro dias de tratamento.

Tabela 8 – Actividade da APX expressa em $\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína.

	Controlo ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína)	Patogénio ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína)	Resultado do teste <i>t</i>	Varição de actividade do controlo para o patogénio em %
rega 1 dia	1,275 \pm 0,0119	1,935 \pm 0,0424	Significativamente diferentes	+ 51,8 %
rega 4 dias	3,3225 \pm 0,0193	2,938 \pm 0,0738	Significativamente diferentes	- 11,6 %
secura 1 dia	1,4600 \pm 0,1597	1,6967 \pm 0,3574	Não significativamente diferentes	-----

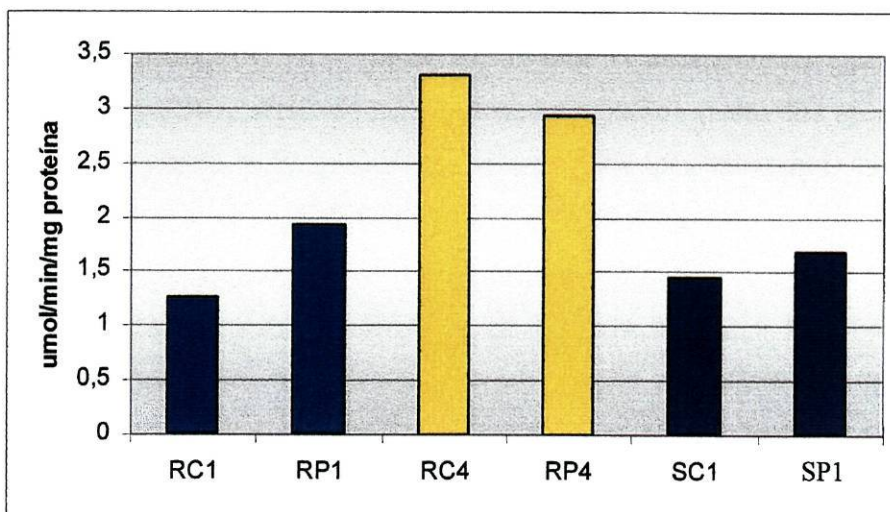


Gráfico 5 – Representação gráfica dos valores de actividade de APX expressos em $\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; RC4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

Em folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica, os resultados obtidos em gel permitiram verificar a presença de duas isoformas de APX denominadas por APX-1 e APX-2. Estas duas isoformas estavam igualmente presentes no material sujeito à acção do *P. infestans*, um dia após infecção (fig. 37). Porém, neste material verificou-se a

presença de uma outra isoforma denominada de APX-3. Dado que esta isoforma surgiu apenas no material infectado, admite-se que terá um papel importante na resposta de defesa ao stress causado pelo patogénio. Quer na situação de não infecção quer na situação de infecção pelo *P. infestans* a actividade da APX-1 foi marcadamente superior à actividade da APX-2. Após um dia de infecção, a presença do patogénio não provocou alterações na actividade da APX-2 mas induziu o aumento de actividade da APX-1 (fig. 37 A). Estes aumentos de actividade estão de acordo com os referidos por Siegel (1993), Mittler e colaboradores (1999) e Yoshimura e colaboradores (2000). O comportamento das diferentes isoformas na presença do inibidor específico de peroxidases do ascorbato permitiu inferir que, a isoforma denominada de APX-1 e a isoforma denominada de APX-3 eram exclusivamente peroxidases do ascorbato, uma vez a sua actividade foi inibida na totalidade na presença do inibidor. No entanto, para a isoforma APX-2 não se verificou uma total inibição na presença do inibidor. Esta não inibição parece indicar que esta isoforma é o resultado de uma co-migração de uma peroxidase do ascorbato com outras peroxidases não específicas do ascorbato (fig. 37 A, B e C).

Após quatro dias de contacto com agente infeccioso verificou-se o mesmo padrão isoenzimático - APX-1, APX-2 e APX-3- obtido para um dia de tratamento com patogénio. Nas plantas não sujeitas ao tratamento com o patogénio surgiu para além da APX-1 e da APX-2 uma nova isoforma denominada de APX-4, que não foi detectada na presença do patogénio (fig. 37 B). Esta isoforma, desaparece na totalidade no gel com inibidor, o que indica tratar-se exclusivamente de uma peroxidase do ascorbato. Relativamente à variação da actividade da diferentes isoenzimas verificou-se que o tratamento com *P. infestans* provocou uma diminuição de actividade da APX-1, no entanto, levou a um aumento da actividade da APX-2. Esta APX-2, na presença de inibidor, não diminuiu a sua actividade o que sugere que esta isoforma era formada exclusivamente por peroxidase não específicas do ascorbato. A diminuição de actividade da APX-1 está de acordo com resultados obtidos por outros investigadores (Vranová *et al.*, 2002) que referem que, a diminuição da actividade da APX durante as interacções incompatíveis com patogénios, permite aumentos dos níveis de H_2O_2 na célula que, por sua vez vão ser importantes em muitas respostas de defesas das plantas nomeadamente no desencadear da Resposta de Hipersensibilidade.

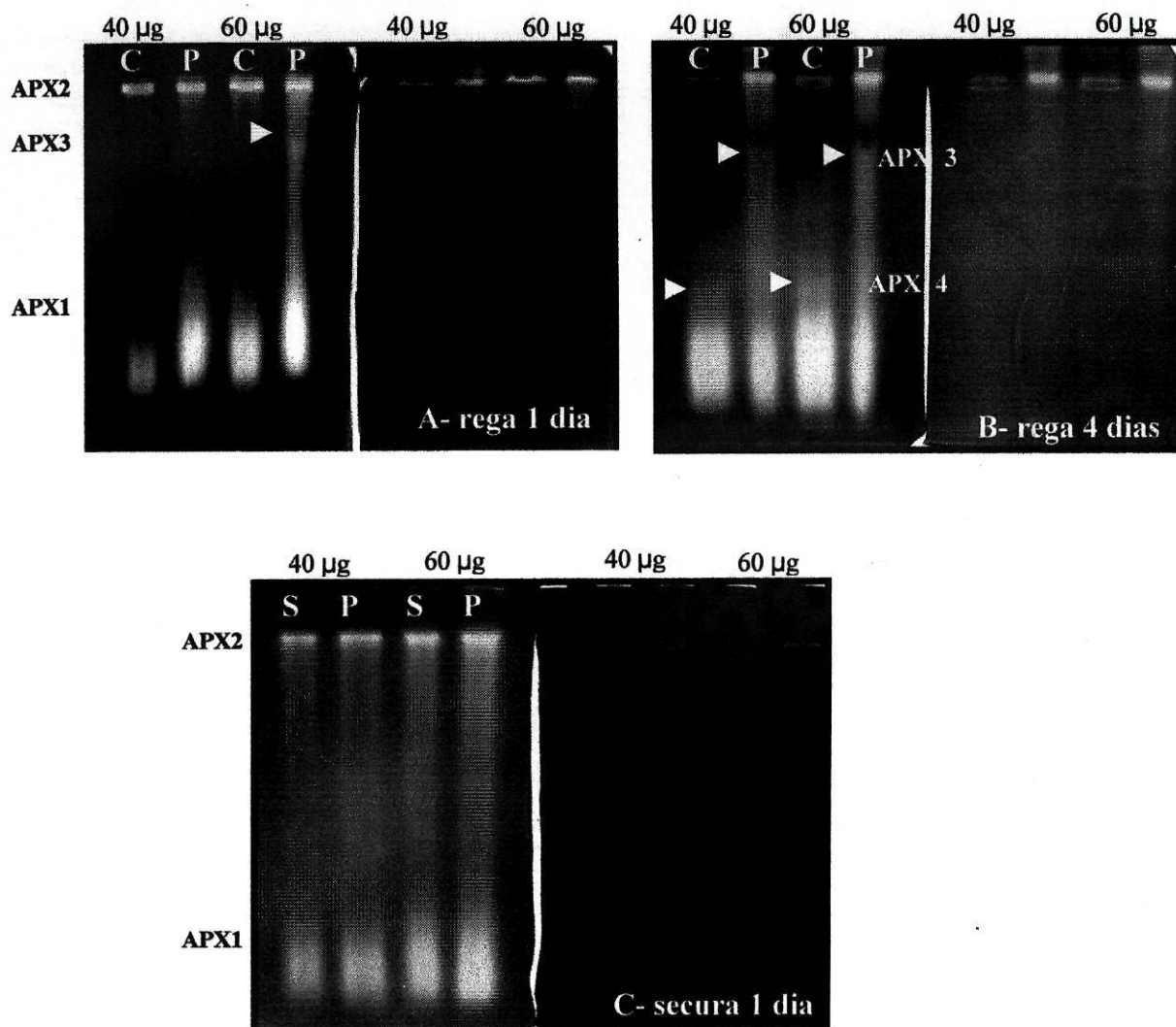


Fig. 37 – Detecção da actividade de isoformas de APX em gel nativo com 40 e 60 µg de proteína. A- situação não carência hídrica 1 dia após tratamento; B- na situação de não carência hídrica 4 dias após tratamento; C- situação de carência hídrica 1 dia após tratamento. Pista C – isoformas em situação de não carência hídrica e sem infecção; Pista P – isoformas em situação de infecção pelo *P. infestans*; Pista S- isoformas situação de carência hídrica e sem infecção. À esquerda - gel sem inibidores; à direita - gel sujeito à acção do inibidor p-HMB. A migração representada é anodal.

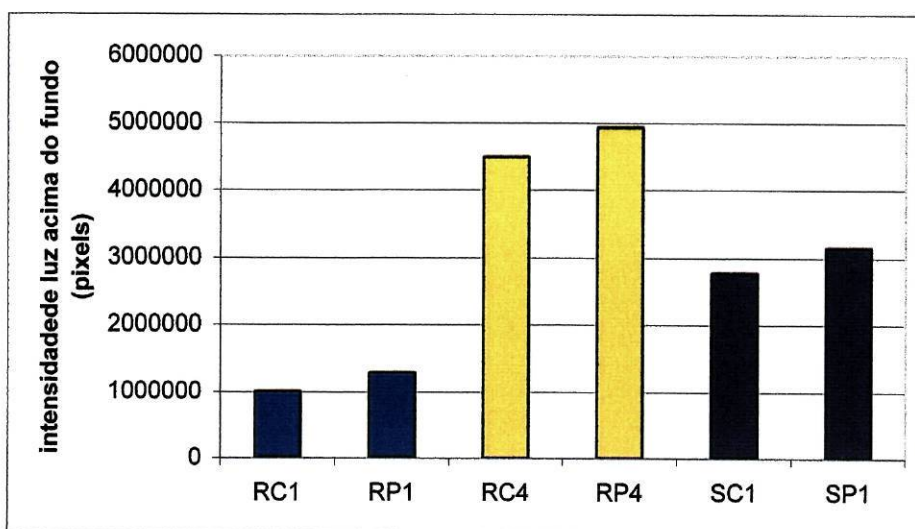


Gráfico 6- Quantificação da intensidade das bandas em gel. O valor obtido corresponde à intensidade de luz obtida acima do fundo que o aparelho regista. A quantificação foi feita nas pistas correspondentes à aplicação de 60 µg de proteínas. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; RC4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

Nas plantas sujeitas a uma situação de carência hídrica o tratamento com o patogénio não alterou o padrão isoenzimático encontrado nas folhas não tratadas com patogénio. Em ambas as situações verificou-se a presença de duas isoformas, a APX-1 e a APX-2 sendo que a actividade da APX-1 foi demarcadamente superior à actividade da APX-2. Após o tratamento com o patogénio, não se verificou alteração significativa da actividade total das APX (tabela 8).

O facto da actividade em plantas sujeitas à secura e não infectadas (um dia após tratamento) ser superior à de plantas não sujeitas a carência hídrica e não infectadas (após um dia de tratamento) pode ser devido ao facto de as primeiras se encontrarem sob stress hídrico o que terá desencadeado uma maior produção de EROs tendo sido necessário as plantas activarem as suas defesas antioxidantes.

3.2- Peroxidases do guaiacol

A GPX é uma enzima capaz de remover o H₂O₂, no entanto, apresenta outras funções que assumem um papel mais importante da defesa contra patogénios. Estas enzimas participam num grande número de processos fisiológicos de defesa, entre eles,

o reforço da parede celular e a reparação de fosfolípidos oxidados. De facto nas três situações estudadas, após tratamento com o patógeno verificou-se um aumento de actividade das GPX (tabela 9, gráfico 7), o que sugere o seu envolvimento na resposta à infecção pelo patógeno. Este aumento de actividade foi mais acentuado em plantas não sujeitas a carência hídrica após quatro dias de tratamento. Este aumento poderá corresponder ao aumento observado no gel representado na fig. 37-B. Este gel efectivamente mostrou, na presença do patógeno, um aumento de actividade da isoforma designada de APX-2 que se verificou ser essencialmente formada por peroxidases não específicas do ascorbato. Possivelmente esta isoforma seria formada por peroxidases do guaiacol.

Tabela 9 – Actividade da GPX expressa em $\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína.

	Controlo ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína)	Patógeno ($\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína)	Resultado do teste <i>t</i>	Varição de actividade do controlo para o patógeno em %
rega 1 dia	1,5838 \pm 0,0654	1,9330 \pm 0, 07305	Significativamente diferentes	+ 22,0%
rega 4 dias	0,1896 \pm 0,0013	1,7865 \pm 0,1210	Significativamente diferentes	+ 842,2%
secura 1 dia	0,1833 \pm 0,0031	0,3546 \pm 0,0160	Significativamente diferentes	+ 93,5 %

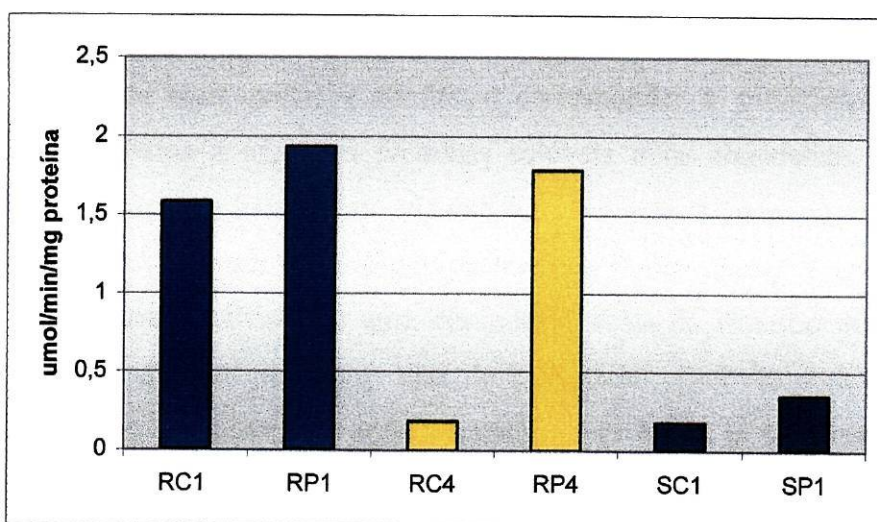


Gráfico 7- Representação gráfica da actividade da GPX expressa em $\mu\text{mol} / \text{min}/\text{mg}$ proteína. RC1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP1- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patógeno; RC4- plantas não

sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com água; RP4- plantas não sujeitas a carência hídrica quatro dias após tratamento com patogénio; SC1- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP1- plantas sujeitas a carência hídrica, um dia após tratamento com patogénio.

Nas plantas controlo não sujeitas a carência hídrica, foram observadas diferenças significativas relativamente à actividade desta enzima, um e quatro dias após tratamento. Após quatro dias os níveis desta enzima baixaram de forma bastante acentuada o que talvez se deva ao facto de ao longo do tempo e paralelamente à senescência da planta, a actividade desta enzima ter diminuído. A baixa actividade observada na situação controlo de plantas sujeitas a secura sugere que, durante a semana em que as plantas estiveram sujeita à falta de água, a actividade desta enzima tenha decrescido, no entanto, novos ensaios deverão ser realizados no sentido de esclarecer a discrepância de valores encontrados nas diferentes situações e esclarecer algumas das interpretações apresentadas.

Como complemento da quantificação da actividade da enzima ao espectrofotómetro, seria bastante informativo realizar a análise do perfil das isoenzimas da GPX por focagem isoeléctrica, no sentido de permitir identificar o número, bem como a intensidade das isoformas presentes em cada uma das situações.

O comportamento das enzimas estudadas nas condições experimentais descritas no material e métodos não é sobreponível aos resultados obtidos em estudo paralelo realizado, no mesmo laboratório, com o mesmo material e com o mesmo patogénio. No entanto, no estudo referido, o tratamento com o patogénio foi realizado em folhas destacadas (Mendes, 2002). Neste estudo as folhas de plantas regadas inoculadas com *P. infestans*, mostraram após um dia de inoculação aumentos de actividade da SOD e quatro dias após o tratamento não foram observadas diferenças significativas (Mendes, 2002). No nosso estudo não se registou aumento de actividade da SOD após um dia de tratamento. Apenas se observou um aumento da actividade após quatro dias da presença do patogénio. O comportamento da APX também foi diferente, dado que no nosso material ocorria um aumento de actividade após um dia de infecção e em folhas destacadas não ocorreu variação de actividade. Após quatro dias de infecção a actividade da APX diminuiu quer no material sujeito à infecção pelo nosso esquema de tratamento quer, no que foi realizado em folhas destacadas. Relativamente à CAT, após

um dia de tratamento o aumento de actividade ocorreu quer no nosso material, quer em folhas destacadas. No entanto, após quatro dias, o nosso estudo observou um decréscimo de actividade enquanto que em folhas destacadas (Mendes, 2002) não foram encontradas diferenças significativas.

A discrepância na resposta ao agente infeccioso de folhas isoladas e de folhas na planta pode ser consequência de estas últimas serem expostas a um maior stresse pois, para além de cada folha poder ser atingida por um maior número de esporos, todas as folhas da planta foram alvo de tratamento. É interessante constatar que a diferença mais notória foi o facto de nas folhas destacadas se observar inicialmente o activar da enzima SOD enquanto que nas folhas tratadas e mantidas na planta ocorreu inicialmente a activação das enzimas envolvidas na remoção do H_2O_2 .

Os diferentes resultados obtidos nos estudos efectuados por várias equipas podem resultar de várias circunstâncias nomeadamente do facto de se utilizarem diferentes cultivares de *S. tuberosum*, de os estudos serem realizados em plantas em diferentes estados de desenvolvimento, do crescimento das plantas ocorrer em diferentes condições, da aplicação do patógeno de formas diferentes ou em quantidades diferentes, entre outros, pelo que é sempre necessário analisar os resultados obtidos com muito cuidado.

4- PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Como já referido, muitas vezes como resposta ao stresse a que as plantas estão sujeitas, um dos mecanismos de defesa adoptados consiste na produção de diversa proteínas. No caso do stresse provocado pela falta de água são produzidas proteínas de membrana, proteínas osmoprotectoras, proteínas cinases entre outras. Durante a interacção entre planta e o patógeno, a resposta incompatível envolve, por exemplo, a produção de proteínas PR. Efectivamente, o padrão de proteínas obtido em plantas que cresceram em situação de não carência hídrica, um e quatro dias após o tratamento com o patógeno, foi efectivamente diferente (fig. 38).

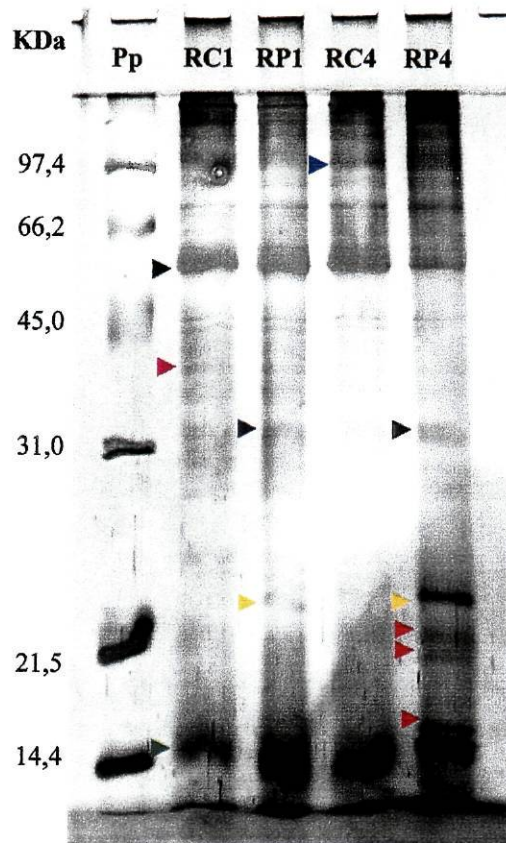


Fig. 38– SDS – PAGE de proteínas solúveis 1 e 4 dias após infecção com patogénio em plantas não sujeitas a carência hídrica. **Pp**- padrão; **RC1**- plantas regadas após um dia de pulverização com água; **RP1**- plantas regadas um dia após infecção com *P. infestans*; **RC 4**- plantas regadas quatro dias após pulverização com água; **RP4**- plantas regadas quatro dias após infecção com *P. infestans*. Os poços foram carregados com 10µg de proteína e a revelação foi realizada segundo a técnica de nitrato de prata.

No gel obtido, a banda que surge mais evidente apresenta aproximadamente tamanho de 55KDa (seta preta) e admite-se corresponder à subunidade maior da RuBisco. Esta proteína é uma das proteínas solúveis mais abundantes nas plantas apresentando por isso uma banda bem evidente no gel comparativamente com os outros polipeptídeos. Os níveis desta proteína não parecem ser muito afectados na presença do patogénio, no entanto, verificou-se uma diminuição desta da situação de um dia de tratamento para a situação de quatro dias de tratamento. Esta diminuição pode ser explicada pelo facto de quatro dias após o tratamento as folhas já se apresentarem em estado de senescência e conseqüentemente ter ocorrido alguma degradação desta proteína. Estes resultados opõem-se aos obtidos em alguns trabalhos efectuados em batateira, que referem que os níveis de mRNA e proteínas da Rubisco são rapidamente reduzidos por uma infecção com o patogénio ou por tratamento com eliciadores (Somssich & Hahlbrock, 1998).

De notar também um aumento da quantidade do polipeptídeo com massa molar de aproximadamente 97 KDa (seta azul claro) com o tempo de infecção do patogénio. Quatro dias após tratamento esta banda surge de forma mais evidente no gel o que indicou um aumento da sua quantidade. Possivelmente, esta banda corresponderá a proteínas que surgem na planta em situações de senescência. Verificou-se também uma diminuição da quantidade do polipeptídeo com aproximadamente 40 KDa (seta rosa) que surge nas plantas após um dia de pulverização mas ao fim de quatro dias já não é observada. Na situação de infecção pelo patogénio surgiram dois polipeptídeos, um de aproximadamente 23 KDa (seta amarela) e outro de aproximadamente de 31 KDa (seta azul escuro). Este aparecimento de proteínas apenas na situação de tratamento com patogénio parece indicar tratar-se de proteínas de defesa, nomeadamente de proteínas PR. Após quatro dias de tratamento com patogénio verificou-se o aparecimento de três novos polipeptídeos de aproximadamente 21, 22 e 15 KDa (setas a vermelho). Estes polipeptídeos podem corresponder a proteínas ou cuja produção é induzida na planta para se defender contra o patogénio não sendo de excluir a possibilidade de corresponder a proteínas do próprio patogénio que infectou a planta. O polipeptídeo com aproximadamente 14 KDa (seta a verde) surge no gel muito corado e com grande espessura nas quatro situações devendo representar a subunidade pequena da RuBisCo.

5- PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Durante o stresse oxidativo, as EROs podem reagir com os lípidos da membrana, danificando a sua estrutura. Estes danos na membrana celular podem ser avaliados através de quantificação de um produto resultante da peroxidação lipídica, como o MDA. Desta forma, quanto maiores forem os níveis de MDA, maiores serão os níveis de peroxidação lipídica e maiores serão os danos nas membranas celulares.

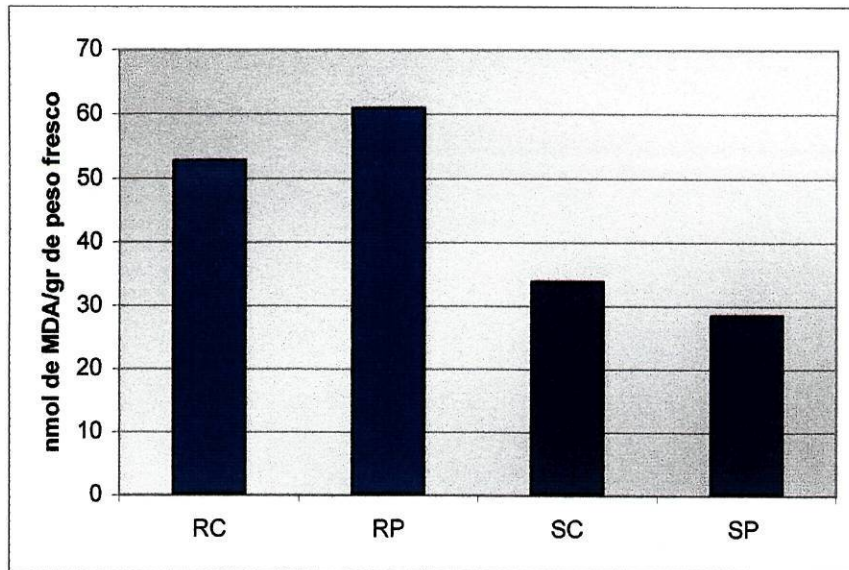
Nas plantas não sujeitas a carência hídrica, verificou-se que a inoculação com o patogénio fez aumentar os níveis de MDA nas células em cerca de 15%, ou seja, fez aumentar os níveis de peroxidação lipídica (tabela 10, gráfico 8). Esta resposta, parece ter por objectivo permitir uma maior resistência da planta ao patogénio, dado que a peroxidação contribui para a morte celular e assim restringe o avanço do patogénio para outros locais da planta, delimitando o seu crescimento ao local de infecção. Estas observações estão de acordo com os resultados obtidos em outros estudos realizadas por Otha *et al.* (1991), Kolomiets *et al.* (2000) e Gobel *et al.* (2002). Este aumento de peroxidação lipídica permite-nos inferir um aumento dos níveis de EROs nas células,

nomeadamente de H_2O_2 , que tem sido proposto ser uma das moléculas responsáveis pela activação das lipoxigenases (Bartozs, 1997).

Nas plantas sujeitas a carência hídrica, os níveis de MDA apresentaram valores inferiores comparativamente com plantas não sujeitas a secura, tendo-se verificado que o tratamento com o patogénio não alterou os níveis de MDA nas células (tabela 10, gráfico 8). Estes resultados podem ser explicados se tivermos em consideração que estas plantas estiveram sujeitas, durante uma semana, à secura. A falta de água como já referido por alguns autores (Moran *et al.*, 1994) leva a uma degradação lipídica o que pode explicar que os níveis de MDA sejam, à partida menores na situação em que as plantas estiveram sujeitas à falta de água. Outra possibilidade para explicar os níveis inferiores de peroxidação lipídica em plantas sujeitas à secura será o facto de nesta situação as plantas possuírem níveis superiores de enzimas que removem as EROs, e assim, diminuírem os níveis de peroxidação lipídica. A não variação verificada com a presença do patogénio, talvez se deva ao facto de a planta já se encontrar numa situação de stresse provocada pela secura que, já teria iniciado este processo degradação lipídica, pelo que, após a infecção não se verificou um segundo aumento deste mecanismo.

Tabela 10 - Peroxidação lipídica expressa em nmol de MDA/g peso fresco de folha de plantas não sujeitas a carência hídrica e sujeitas a carência hídrica após um dia de tratamento.

	Media de valores em nmol de MDA/ g peso fresco		Resultado do teste <i>t</i>	Variação de peroxidação do controlo para o patogénio em %
	controlo	patogénio		
Rega	52,9 ± 2,2030	61,0 ± 1,6979	Valores significativamente diferentes	+ 15,3 %
Secura	33,9 ± 1,9424	28,5 ± 1,3148	Valores não significativamente diferentes	_____



7

Gráfico 8- Peroxidação lipídica expressa em nmol de MDA/gr peso fresco. RC- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; RP- plantas não sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio; SC- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com água; SP- plantas sujeitas a carência hídrica um dia após tratamento com patogénio.

Os resultados obtidos foram calculados por grama de peso fresco e não por grama de peso seco o que, desde logo, pode introduzir algum erro na comparação das duas situações estudadas, uma vez que se verificou que os materiais das diferentes situações de estudo apresentavam diferentes teores hídricos. Para clarificar algumas dúvidas relativas aos resultados obtidos seria importante repetir estas técnicas, mas agora exprimindo o resultado em gramas de peso seco.

Este parâmetro apenas foi avaliado para as plantas após um dia de tratamentos porque se pretendia avaliar o dano causado pelo stresse oxidativo gerado pela infecção e, ao fim de quatro dias, a senescência que era desencadeada nas folhas iria também contribuir para a peroxidação dos lípidos.

Quando uma planta se encontra sob condições de stresse, os locais da planta mais directamente afectados dependem de vários factores como o tipo de stresse e o estado de desenvolvimento da planta. No caso do stresse causado pela falta de água ou pelo tratamento com patogénio, um dos órgãos da planta, mais visivelmente afectado são as folhas. As alterações macroscópicas visíveis neste órgão foram a presença de manchas necróticas e a clorose. Estes sintomas, encontram-se associados à deterioração

de vários organelos celulares que parece ser o resultado do aumento de produção de EROs, que podem interagir com os lípidos das membranas, causando danos na sua estrutura. Assim, paralelamente ao estudo bioquímico, realizaram-se observações ao Microscópio Óptico e Microscópio Electrónico, no sentido de avaliar as principais alterações morfológicas e citológicas que ocorrerem nas células de folhas sujeitas à infecção pelo *P. infestans*.

Os estudos foram realizados em folhas infectadas pelo método descrito em Material e Métodos. Além deste material, foi também realizado o estudo em folhas destacadas tratadas com patogénio (material cedido pelo laboratório). O tratamento do último material foi realizado colocando três gotas (20 μ L) de solução contendo os zoósporos com a mesma concentração utilizada no nosso trabalho, em três locais da superfície abaxial da folha destacada da planta. As imagens são relativas a folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica após quatro dias de tratamento com água (controlo) ou com solução de zoósporos (patogénio).

Pela observação da imagem 39 podemos referir que, em situação de não stresse para as plantas, o mesófilo de folha de batateira é constituído por parênquima em paliçada e parênquima lacunoso. A epiderme consiste numa única camada de células com estomas em ambas as páginas da folha.

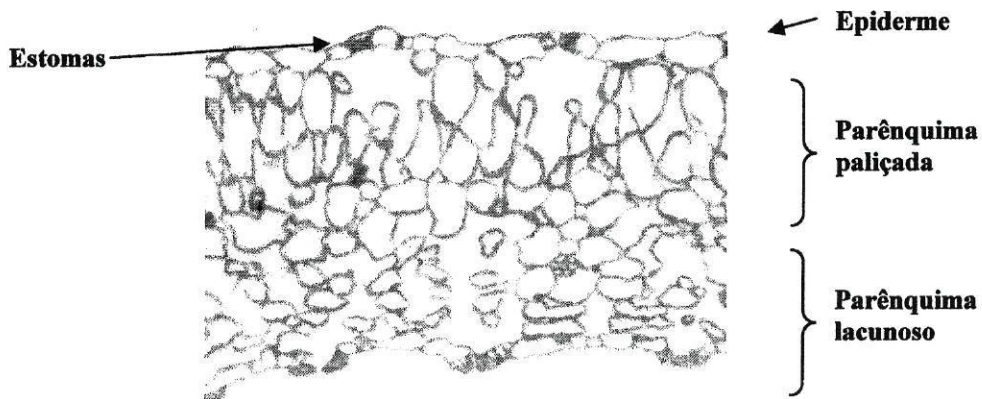


Fig. 39 - Aspecto ao MO de folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica e não sujeitas ao ataque de patogénios. Ampliação 10 X.

Esta organização celular, contudo, pode sofrer alterações quando a planta fica sujeita a um conjunto variadíssimo de factores quer bióticos quer abióticos. No caso da infecção pelo patogénio, as folhas apresentaram uma clorose acentuada e a presença de manchas necróticas. Nas folhas tratadas com o *P. infestans*, uma das consequências

observadas foi o aparecimento de lesões necróticas. Estas lesões surgiram quer no tratamento em folhas destacadas quer nas folhas nas plantas.

Como ilustrado na figura 40, nas folhas destacadas, na zona não necrótica da folha mas que circunscreve a zona necrótica verificou-se que o tratamento com o patogénio provocou, uma ligeira plasmólise celular sendo, no entanto, ainda bem visível a organização das células do mesófilo em parênquima empalçada e parênquima lacunoso. Esta desorganização também foi observada por Milat *et al.* (1991) na interacção de um patogénio com folhas de tabaco. Na região necrosada foi mais evidente o estado avançado de plasmólise das células, e a desorganização do conteúdo celular (fig. 40).

Quando o tratamento com o patogénio ocorreu em folhas ainda integradas na planta, os sintomas foram semelhantes aos descritos anteriormente embora a desorganização celular tenha sido mais evidente na região periférica à necrose (fig. 41). Esta diferença de comportamento pode ser devido por um lado, ao facto do tratamento com o patogénio na planta ter sido mais intenso uma vez que as folhas na planta sofreram a infecção em vários pontos, ocorrendo reacção, como é visível na figura 34, num maior número de células comparativamente com as folhas destacadas em que a reacção à infecção surgiu apenas nos locais de inoculação que eram em número inferior.

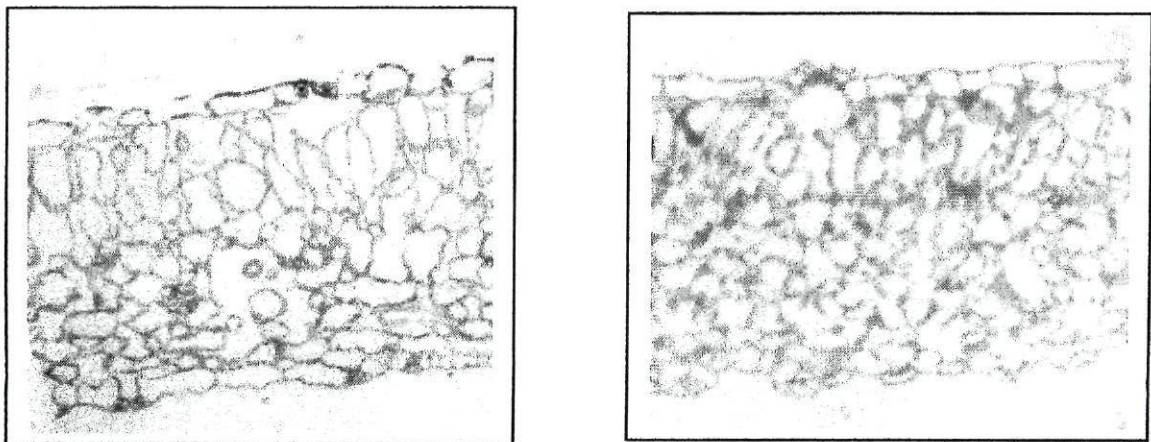


Fig. 40- Aspecto ao MO da região não necrótica (esquerda) e região necrótica (direita) de **folhas destacadas** 4 dias após contacto com o patogénio. Ampliação 10 X.

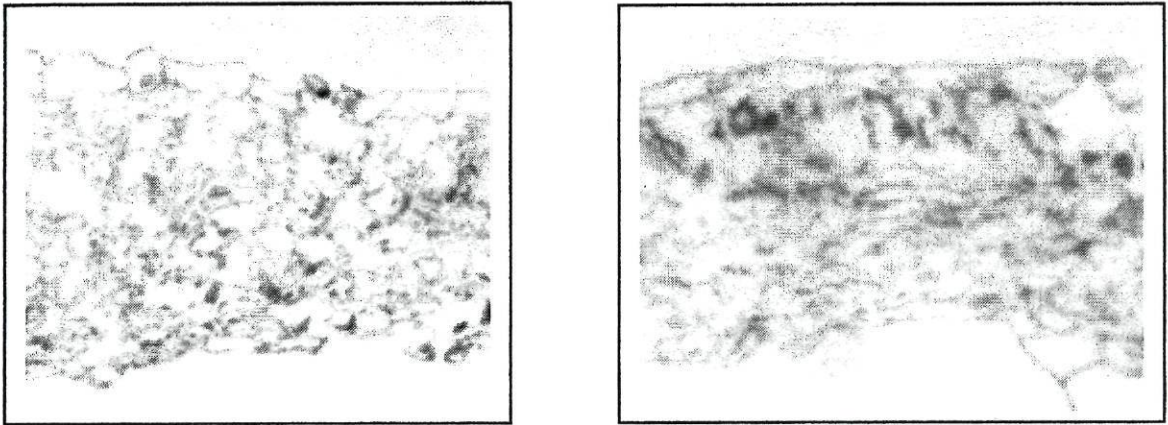


Fig. 41- Aspecto ao MO da região não necrótica (esquerda) e necrótica (direita) de folhas 4 dias após pulverização com patogénio (**em planta**). Ampliação 10 X.

Observações realizadas ao Microscópio Electrónico, permitiram estudar o grau de afectação de diferentes organelos celulares, nomeadamente cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas quando as plantas estiveram sujeitas ao tratamento (fig. 42, fig. 43, fig. 44, fig. 45).

Nas plantas colocadas em situação de não carência hídrica e sem infecção (fig. 42 e 43), foram observadas células com cloroplastos ricos em plastoglobulos, alguns grãos de amido e um sistema membranar bem desenvolvido apresentando numerosos tilacoides associados em grana, sendo bem visível as duas membranas que revestem os cloroplastos. Foram observados também peroxissomas e mitocôndrias. Em alguns peroxissomas foi possível observar a presença de uma estrutura paracristalina, estrutura essa que, quando presente, reflecte o teor da enzima catalase na célula.

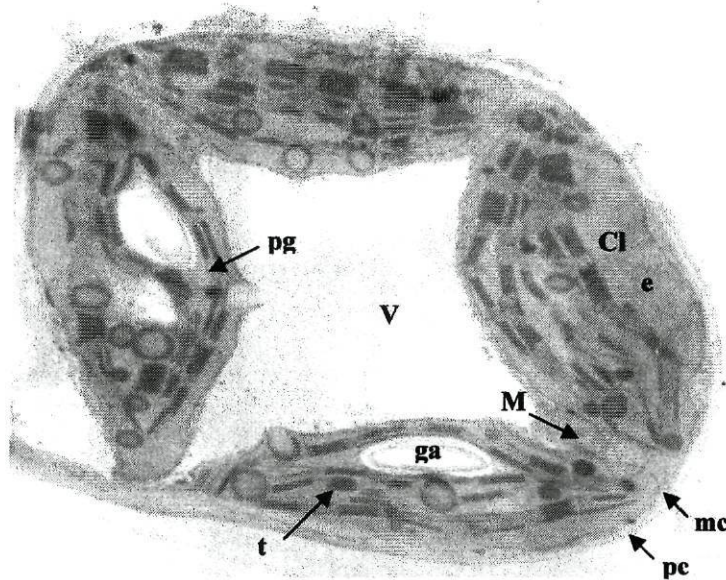


Fig. 42 - Aspecto de célula de folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica nem à infecção pelo patógeno. Visível a organização celular com vacúolo central (V), quatro cloroplastos (Cl) junto da parede celular; mitocôndrias (m); parede celular (pc), membrana celular (mc). Nos cloroplastos são bem evidentes os tilacoides (t) com grana e a intergrana, grãos de amido (ga), os plastoglobulos (pg); estroma (e) (8000 X).

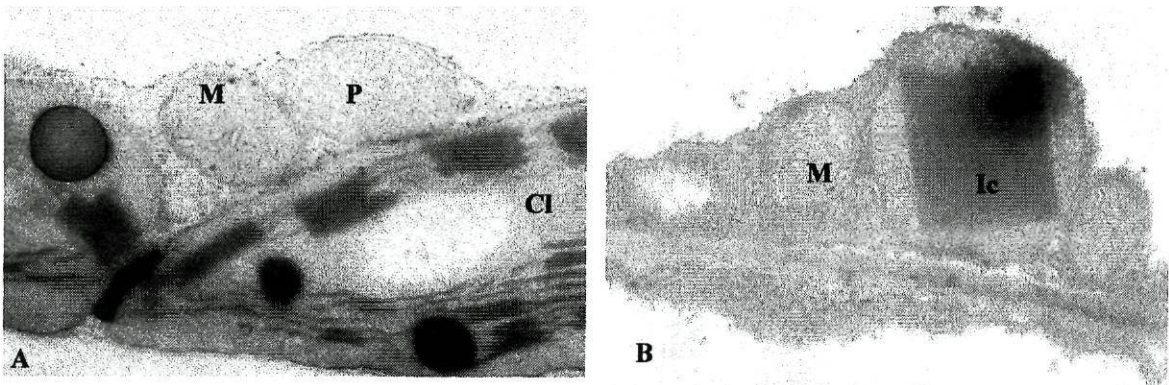


Fig. 43 - Células de folhas de plantas não sujeitas a carência hídrica e não sujeitas à infecção pelo patógeno. A- imagem evidenciando os cloroplastos (Cl), uma mitocôndria (M) e o peroxissoma (P) da célula (10000X). B- pormenor de um peroxissoma (P) com a sua membrana a envolver uma matriz granulosa com uma inclusão paracristalina (Ic) (10000X)

Nas plantas colocadas em situação de não carência hídrica mas sujeitas à infecção pelo patógeno verificou-se que a região periférica às manchas necróticas, apresentava células com organelos um pouco afectados principalmente ao nível dos cloroplastos. A membrana do tonoplasto também foi afectada sendo possível observar a

sua destruição em algumas zonas. Também foram observadas alterações no citoplasma que se apresentou com aspecto granuloso (fig. 44). As mitocôndrias não apresentaram alterações dignas de registo. No entanto, estudos realizados por Naton *et al.* (1996), verificaram um aumento do número de mitocôndrias imediatamente após infecção com *P. infestans*, que segundo os autores, seria para permitir uma maior produção de energia necessária para activação dos mecanismos de resposta das células. As células da região necrosada mostraram alterações profundas tendo sido observado apenas o resto das estruturas celulares. Todo o sistema membranar surgiu alterado nomeadamente cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas (fig. 45).

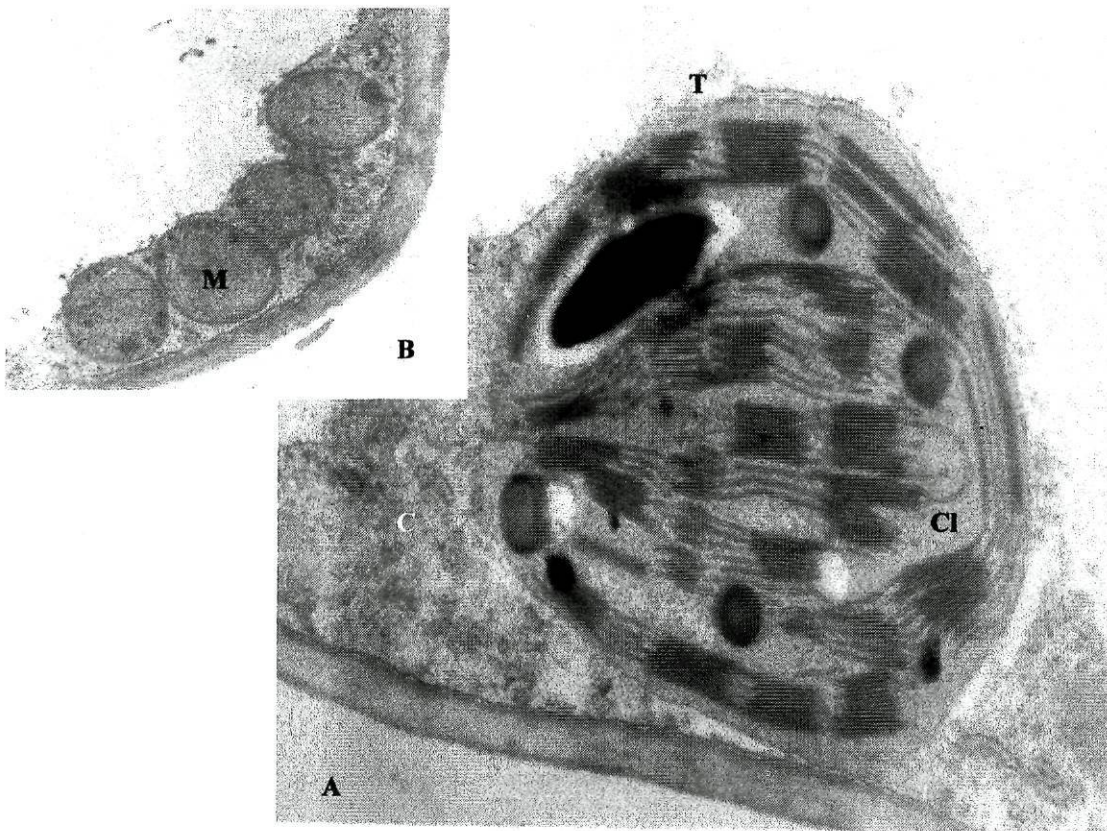


Fig. 44– Porção de célula de folha da região não necrótica de folhas de planta não sujeitas a carência hídrica tratadas com patógeno. A- Cloroplasto não evidencia grandes alterações, sendo apenas visível a vesiculação no citoplasma granuloso (C) e a ruptura do tonoplasto (T) da célula junto ao cloroplasto; B- Mitocôndrias onde são bem visíveis as cristas mitocondriais, a membrana interna e externa e alguns grânulos electronodensos no seu interior (12500X).

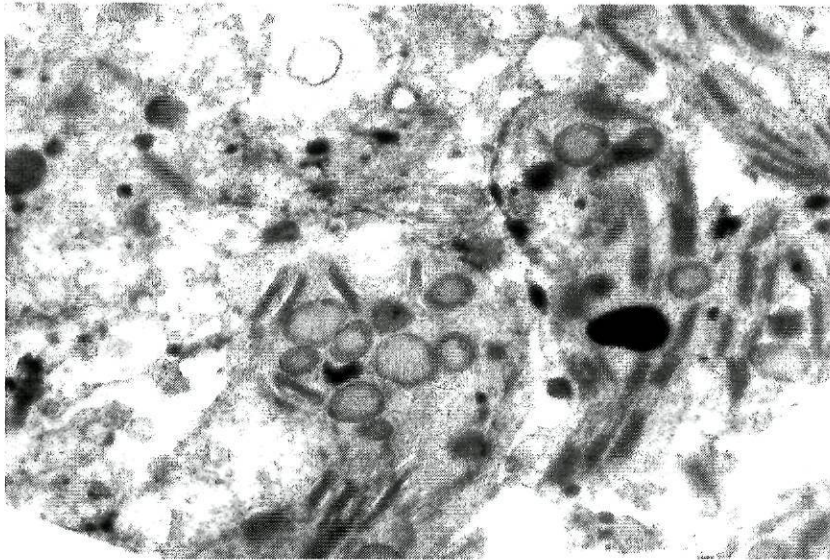


Fig. 45— Célula de folha da região necrótica de folhas de planta não sujeita a carência hídrica tratada com patogénio, evidenciando uma grande desorganização de todo o conteúdo celular (8000X).

Esta componente do trabalho não foi estudada como pretendido devido ao impedimento causado por uma avaria ocorrida no microscópio electrónico do laboratório.

IV – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos permitiram constatar que o stresse provocado pela falta de água e pelo tratamento com *P. infestans* desencadeou alterações a nível do sistema antioxidante das células.

A análise global do comportamento das diferentes enzimas estudadas mostrou, após um dia de tratamento com o *P. infestans*, um aumento de actividade das enzimas responsáveis pela eliminação do Peróxido de Hidrogénio, como CAT e a APX e a não alteração da actividade da SOD. Este comportamento leva-nos a considerar que na fase inicial da infecção predominou a formação do Peróxido de Hidrogénio sendo a resposta inicial de defesa da planta induzir o aumento de actividade destas enzimas de forma a baixar os níveis desta ERO. Contrariamente, após quatro dias de infecção, a actividade da SOD foi significativamente mais elevada no material infectado e a actividade da CAT e da APX decresceu ligeiramente. A diminuição de actividade destas últimas enzimas ocorreu nas células provavelmente no sentido de desencadear uma resposta de defesa mais específica ao ataque do patogénio, dado que a diminuição de actividade destas enzimas, permitirá elevar os níveis de H_2O_2 nas células e assim, desencadear várias respostas de defesa nomeadamente a resposta de hipersensibilidade, que tem um papel importante no controlo da área de infecção do patogénio. Seria interessante verificar se este decréscimo de CAT e de APX surgirá mais cedo, ou seja, ao segundo ou terceiro dia de infecção.

O estudo demonstrou também que a presença do patogénio não alterou o padrão isoenzimático da SOD. A isoforma CAT-2 mostrou ser mais sensível ao patogénio. Relativamente à APX, a isoforma APX-3 parece ser induzida pelo patogénio. Quanto à GPX verificou-se que o *P. infestans* induziu a actividade da enzima.

De realçar que o nosso estudo mostrou que plantas que estavam num estado de stresse hídrico moderado manifestaram um menor grau de dano foliar após a infecção com *P. infestans*, tendo sido demonstrado que a secura induz alguns sistemas de defesa das células, nomeadamente o sistema antioxidante- SOD, CAT e APX- que prepara melhor a planta para a infecção pelo patogénio.

A análise das proteínas solúveis de plantas em situação de não carência hídrica, mostrou que a presença do patogénio causava alterações no padrão electroforético de polipeptídeos, detectando-se um aumento de produção de certos polipeptídeos, diminuição de outros e aparecimento de novos polipeptídeos. O aumento ou o

aparecimento de novos polipeptídeos em plantas tratadas com patogénio pode ser indicativo da produção de proteínas de defesa, não sendo de excluir a possibilidade de serem proteínas do próprio patogénio.

Quanto aos níveis de peroxidação lipídica, estes aumentaram aquando do tratamento com o patogénio na situação de não carência hídrica, no entanto, na situação de *secura*, estes níveis não sofrem alterações significativas. Este aumento de peroxidação lipídica em plantas não sujeitas a falta de água mas tratadas com patogénio, permite explicar a *clorose* e as manchas necróticas observadas após infecção. A não alteração em situações de *secura* sugere que a planta já se encontrava com as defesas antioxidantes activadas. As alterações morfológicas observadas nas folhas foram também acompanhadas por uma destruição progressiva a nível dos organelos celulares.

Sabendo que, em condições ambientais adversas, as plantas sofrem *stresse oxidativo* e que este *stresse* pode ser atenuado pela actuação de enzimas antioxidantes, como a SOD, a CAT e a APX, parece sensato concluir que plantas com mecanismos antioxidantes melhorados provavelmente terão grande utilidade agrícola, uma vez que, teoricamente, apresentarão maior capacidade de defesa comparativamente com plantas normais. Assim, o desenvolvimento de técnicas moleculares de forma a permitir controlar os níveis apropriados das enzimas antioxidantes, no local e no tempo, de acordo com a fase de desenvolvimento da planta e com o *stresse* que a está a afectar, poderá permitir abrir novos caminhos para a compreensão dos papéis funcionais de cada isoforma, bem como permitir abrir novas perspectivas para o melhoramento das espécies agrícolas a nível mundial.

V- Bibliografia

- Able A., Guest D., Sutherland M. (2000). Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*. Vol. 124 : 899-910.
- Agrios G. (1986). Fitopatologia. Editorial Limusa. Academic press, Inc.
- Allan A., Fluhr R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The plant cell*. Vol. 9: 1559-1572.
- Allen R. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*. Vol. 107: 1049-1054.
- Alscher R., Donahue J., Cramer C. (1997). Reactive oxygen species and antioxidantes: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*. N.º 100: 224-233
- Alvarez M., Lamb C. (1997). Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance in Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1-19.
- Amako K., Chen G-X., Asada K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidases and chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant Cell Physiology*. Vol. 35: 497-504
- Apostol I., Heinstein P., Low P. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology*. Vol. 90: 109-116.
- Arisi A-C., Cornic G., Jouanin L., Foyer C. (1998). Overexpression of iron superoxide dismutase in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide Methyl Viologen. *Plant Physiology*. Vol. 117: 565-574.
- Arrigo, 1999 citado por Vranovrá E., Inzé D. & Breusegem F. (2002).
- Asada K. (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants in Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Asada, 1992 citado por Asada K. (1997).
- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review plant physiology molecular biology*. Vol. 50: 601- 639.

- Auh C-K., Murphy T. (1995). Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ e H₂O₂ by *Phytophthora* elicitor- stimulated rose cells. *Plant Physiology*. Vol. 107: 1241-1247.
- Azevedo C. (1999). *Biologia Celular e Molecular*. 3^o edição. Lidel- edições técnicas, Lda.
- Baker C., Orlandi E. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review Phytopathology*. Vol. 33: 299-321.
- Baker C., Orlandi E., Mock N. (1993). Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in Tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiology*. Vol. 102: 1341-1344.
- Barbosa, 1884 citado por Beça M. (1987).
- Barroso *et al*, 1999 citado por Lopez-Huertas E., Charlton W., Johnson B., Graham I., Baker A. (2000).
- Bartosz, G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta physiologiae plantarum*. Vol. 19. N.º 1: 47-64
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. Vol. 44:276-287.
- Beça M. *Solanum Tuberosum* L. (1987). Aspectos da sua morfologia, fisiologia e fitopatologia. Tese mestrado. FCUP
- Beligni M., Fath A., Bethke P., Lamattina L., Jones R. (2002). Nitric Oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in Barley aleurone layers. *Plant Physiology*. Vol. 129: 1642- 1650.
- Beligni M., Laxalt A., Lamattina L. (1999). Temporal and spatial patterns of GAPCDHc m RNA accumulation during an incompatible potato- *Phytophthora infestans* interaction. Comparison with a compatible interaction. *Physiologia plantarum*. Vol. 105: 280- 287.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. (2003). Antioxidantes, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. Vol. 91: 179- 194.
- Bolwell, G., Bindschedler L., Blee K., Butt V., Davies D., Gardner S., Gerrish C., Minibayeva F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of experimental botany*. Vol. 53: 1367- 1376.
- Bowler C., Camp W., Montagu M., Inzé D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 13 (3): 199- 218.

- Bowler C., Montagu M., Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review plant physiology molecular biology*. Vol. 4. Annual review: 83-116
- Bowler G., Wojtaszek P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence- a broad perspective. *Physiology and molecular plant pathology*. Vol : 347-366.
- Bradley *et al*, 1992 citado por Alvarez M.; Lamb C.(1997).
- Brasier C. (1992). Evolutionary biology of Phytophthora. Part I: Genetic system, sexuality and the generation of variation. *Annual Review Phytopathology*. Vol. 30: 153- 171.
- Bray E., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000) Responses to Abiotic Stresses in Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Edição de Buchanan B. & Gruissem W. American Society of Plant Physiologists.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. *American Society of Plants Physiologists*. Rockville, Maryland.
- Bunkelmann J., Trelease R. (1996). Ascorbate peroxidase - a proeminent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology*. Vol. 110 : 589 – 598.
- Butler E., Jones S. (1949). *Plant Pathology*. MacMillan e Co. Ltd. London.
- Cadena, Boveris (1980) citado por Scandalios J., Guan L.; Polidoros A. (1997).
- Chai, Doke, 1987 citado Doke, 1997
- Chai, Doke, 1987 citado por Baker C. ; Orlandi E., 1995
- Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels C., Sandermann H., Montagu M., Inzé D., Camp W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Sci. USA*. Vol. 95: 5818- 5823.
- Chance *et al.*, 1979 citado por Scandalios J., Guan L. & Polidoros A. (1997).
- Chen Z., Silva H., Klessig D. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*. Vol. 262: 1883- 1886.
- Cohen Y., Gisi U., Niderman T. (1993). Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology*. Vol. 83: 1054-1062.
- Collinge D., Borch J., Madriz-Ordenana K., Newman M-A. (2001). The responses of plants to pathogens in Molecular analysis of plant adaptation to the environment editado por Hawkesford M. & Buchner P. Kluwer Academic Publishers. Netherlands 131-158.

- Coquoz J-L., Buchala A., Meuwly Ph., Métraux J-P. (1995). Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Phytopathology*. Vol. 85: 1219- 1224.
- Conklin P., Pallanca J., Last R., Smirnoff N. (1997). L- Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant *vtc*¹. *Plant Physiology*. Vol. 115: 1277-1285.
- Cutter E. (1992). Structure and development of the potato plant in *The potato Crop* edited by Harris P.. Second edition. Chapman & Hall, London :65-161.
- Cuypers B., Hahlbrock. K. (1988). Immunohistochemical studies of compatible and incompatible interactions of potato leaves with *Phytophthora infestans* and the nonhost response to *Phytophthora megasperma*. *Canadian Journal Botany*. Vol. 66: 700- 705.
- Dangl J., Dietrich R., Richberg M. (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant- microbe interactions. *The plant cell*. Vol. 8: 1793-1807.
- Davis *et al.*, 1993 citado por Alvarez M. & Lamb C. (1997).
- Del Rio L., Corpas F., Sandalio L., Palma J., Gómez M., Barroso J. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53. N.º 372: 1255- 1272.
- Doke *et al*, 1991 citado por Doke N. (1997).
- Doke N., Miura Y. (1995). In vitro activation of NADPH-dependent O₂- generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiological and Molecular plant pathology*. Vol. 46: 17-28 (abstract)
- Doke N. (1997). The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress in *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 785- 809.
- Doke N., Miura Y., Sanchez L., Park H, Noritake H., Yoshioka H., Kawakita K. (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for bio-defense: a review. *Gene*. Volume 1799: 45-51.
- Doke, 1983 citado por Bartosz G. (1997).
- Dorey *et al.*, 1998 citado por Vranovrá E., Inzé D., Breusegem F. (2002).
- Esau K. (1976). Anatomia Vegetal. Ediciones Omega S. A. Barcelona.

- Fernie A., Willmitzer L. (2001). Molecular and Biochemical Triggers of potato tuber development. *Plant Physiology*. Vol. 127: 1459-1465.
- Flohé L., Otting F. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology*. Vol 105: 93- 104
- Fourcroy O. (1999). Iron and oxidative stress in plants in Plant responses to environmental stress, editado por. Smallwood M., Calvert C. & Bowles D. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Foyer C., Halliwell B. (1976). The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*. Vol. 133:21-25.
- Foyer C. (1997). Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis in Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press:587- 613
- Fridovich (1969) citado por Scandalios (1997).
- Funchs *et al.* 1997 citado por Scandalios (1997).
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*. Vol. 261: 754-756
- Geetha H., Shetty H. (2002). Expression of oxidative burst in cultured cells of pearl millet cultivars against *Sclerospora graminicola* inoculation and elicitor treatment. *Plant Science*. Article in press: 1-8
- Gobel C., Feussner I., Hamberg M., Rosahl S. (2002). Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 1584: 55-64
- Grant J., Loake G. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*. Vol. 124 :21-29.
- Greenberg J. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual review plant physiology molecular biology*. Vol. 48 : 525 - 545
- Guan & Scandalios, 1996 citado por Scandalios J., Guan L., Polidoros A. (1997).
- Gupta A., Webb R., Holaday A., Allen R. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiology*. Vol. 103: 1067-1073.
- Hammond-Kosack K., Jones D. (2000) Responses to Plant Pathogens in Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Edição de Buchanan B. ; Gruissem W. American Society of Plant Physiologists.

- Haupt-Herting S., Fock H. (2002). Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis. *Annals of botany*. Vol. 89: 851-859
- Hauptmann N., Cadenas E. (1997). The oxygen paradox: Biochemistry of active oxygen. in *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press:1-19.
- Hawkes J. (1992). History of the Potato in The potato Crop. Edição de Harris P.. Second edition. Chapman & Hall, London: 1 –11.
- Heald F. (1943). Introduction to plant pathology. Second edition. McGraw-Hill Book Company, Inc.
- Heil M., Bostock R. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany*. Vol. 89: 503-512.
- Hide G., Lapwood D. (1992). Disease aspects of potato production in The potato Crop edited by Harris P.. Second edition. Chapman & Hall, London : 403- 437.
- Hohl H., Suter E. (1976). Host- parasite interfaces in a resistance e susceptible cultivar of *Solanum tuberosum* inoculated with *Phytophthora infestans*: leaf tissue. *Canadian Journal Botany* Vol 54: 1956-1970.
- Horton D., Sawyer R (1985) The potato as a world food crop, with special reference to developing areas in *Potato Physiology* edited by Li P. Academic Press: 1- 34.
- Houot V., Etienne P., Petitot A-S., Barbier S., Blein J-P., Suty L. (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of experimental botany*. Vol. 52 N.º 361: 1721-1730.
- Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P., Arrese- Igor C., Becana M. (1998). Oxidative damage in Pea Plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*. Vol. 116: 173-181.
- Jabs, 1999 citado por Vranovrá E., Inzé D.; Breusegem F. (2002).
- Jacoby H., Spero, L. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem*. Vol 44:301-305.
- Jiang M., Zhang J. (2002). Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of experimental botany*. Vol. 53. N.º 379: 2401- 2410.

- Jiménez A., Hernández J., Del Rio L., Sevilla F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of Pea leaves. *Plant Physiology*. Vol. 114: 275- 284.
- Kamoun S., Huitema E., Vleeshouwers V. (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends in plant science*. Vol 4. N.º 5: 196-200.
- Kamoun S., West P., Vleeshouwers V., Groot K., Govers F. (1998). Resistance of *Nicotiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *The Plant Cell*. Vol. 10: 1413- 1425.
- Kauss H., Jeblick W. (1996). Influence of salicylic acid on the induction of competence for H₂O₂ elicitation. Comparison of Ergosterol with other elicitation. *Plant Physiology*. Vol. 111: 755- 763.
- Kliebentein D., Monde R-A., Last R. (1998). Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology*. Vol. 118: 637- 650.
- Kolomiets M., Chen H., Gladon R., Braun E., Hannapel D. (2000). A leaf lipoxigenase of potato induced specifically by pathogen infection. *Plant Physiology*. Vol. 124: 1121-1130.
- Kosaki A., Takeba G. (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature*. Vol. 384: 557- 560.
- Kumar G., Knowles N. (1993). Changes in lipid peroxidation and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. *Plant Physiology*. Vol. 102: 115-124.
- Lamb C., Dixon R. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review plant physiology plant molecular biology*. Vol. 48: 251-275
- Lamb C., Dixon R. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. Vol. 48 : 251- 275.
- Lamb, 1994 citado por Alvarez M., Lamb C., 1997.
- Langebartels C., Wohlgemuth H., Kschieschan S., Grun S., Sandermann H.(2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. Article in press.
- Langebartels C., Wohlgemuth H., Kschieschan S., Grun S., Sandermann H. (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology biochemistry*. Article in Press.

- Lavine, A., Tenhaken, R., Dixon R., Lamb C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. Vol. 79: 583-593.
- León *et al.*, 1995 citado por Wu G., Shortt B., Lawrence E., León J., Fitzsimmons K., Levine E., Raskin I., Shah D. (1997).
- Levine A., Tenhaken R., Lamb C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. Vol. 79: 583- 593.
- Lopez-Huertas E., Charlton W., Johnson B., Graham I., Baker A. (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal*. Vol. 19 . N.º 24: 6770-6777.
- Lopez-Huertas E., Charlton W., Johnson B., Graham I. & Baker A. (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal*. Vol 19. N.º 24: 6770-6777.
- Macpherson *et al.*, 1993 citado por Foyer C., 1997.
- Malan *et al.*, 1990 citado por Alscher R., Donahue J., Cramer C. (1997).
- Mann & Keilin, 1938 citado por *in* Scandalios J. (1993)
- Martinez C., Loureiro M., Oliva M., Maestri M. (2001). Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science*. Vol. 160: 505-515.
- Matters, Scandalios, 1986 citado por Alscher R., Donahue J., Cramer C. (1997).
- McDowell J., Dangl J. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in plant science*. Vol. 25: 79-82
- McKersie B., Chen Y., Beus M., Bowley S., Bowler C., Inzé D., D'Halluin K., Botterman J. (1993). Superoxide dismutase tolerance of freezing stress in transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*. Vol. 103: 1155- 1163
- Mehdy M. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology*. Vol. 105: 467-472.
- Mendes S. (2002). Actividade e polimorfismo da Superóxido Dismutase, catalase e Peroxidase do ascorbato em batateira (*Solanum tuberosum* L.) inoculada com *Phytophthora infestans*. Dissertação de Mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Milat M-L., Ducruet L-M., Ricci P., Marty F., Blein J-P. (1991) Physiological and structural changes in tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology*. Vol. 81: 1364- 1368.

- Mithofer A., Daxberger A., Fromhold-Treu D., Ebel J. (1997). Involvement of an NAD(P)H oxidase in the elicitor-inducible oxidative burst of soybean. *Phytochemistry*. Vol. 45. N.º 6: 1101- 1107
- Mittler R., Zilinskas B. (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gel by inhibition of ascorbat-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*. Vol 212: 540-546.
- Mittler R., Lam E., Shulaev V., Cohen M. (1999). Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Molecular Biology*. Vol. 39: 1025- 1035.
- Moller I. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review plant physiology molecular biology*. Vol. 52 : 561-591
- Moran J., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R., Aparicio-Tejo P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. Vol. 194: 346-352.
- Naton B., Hahlbrock K., Schmelzer E. (1996). Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured Parley cells. *Plant physiology*. Vol. 112: 433 –444.
- Niebet *et al*, unpublished citado em Scandalios J., Guan L., Polidoros A. (1997).
- Niki *et al.*, 1984 citado por Polle A. (1997).
- Noctor G., Foyer C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping oxigen under control. *Annual review plant physiology molecular biology*. Vol. 49 : 249-279.
- Noel G., Madrid E., Bottini R., Lamattina L. (2001). Indole acetic acid attenuates disease severity in potato- *Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol. 39: 815- 823.
- Ogren, 1984 citado em Foyer A. (1997).
- Ohta H., Shida K., Peng Y-L., Furusawa I., Shishiyama J., Aibara S., Morita Y. (1991). A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiology*. Vol. 97: 94-98.
- Otte O., Barz W. (1996). The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of the two cell wall structural proteins. *Planta*. Vol. 200: 238- 246.
- Övar & Ellis, (1997) citado por Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T. Yabuta Y., Yoshimura K. (2002).

- Park H.-J., Doke N., Miura Y., Kawakita K., Noritake T., Komatsubara H. (1998). Induction of a sub-systemic oxidative burst by elicitor- stimulated local oxidative burst in potato plant tissues: a possible systemic signaling in systemic acquired resistance. *Plant Science*. Vol. 138 : 197-208
- Pastori G., del Río L. (1994). An activated-oxygen- mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of *Pisum sativum* L. Leaves. *Planta*. Vol. 193: 385-391.
- Pastori G., del Río L. (1997). Natural senescence of Pea leaves- An activated oxygen mediated function for peroxisomes. *Plant Physiology*. Vol. 113: 411- 418.
- Pastori G., Foyer C. (2002). Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid- mediated controls. *Plant Physiology*. Vol. 1129: 460-468.
- Pastori & Trippi (1992) citado por Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T. Yabuta Y., Yoshimura K. (2002).
- Pellinen R., Korhonen M-S., Tauriainen A., Palva E., Kangasjarvi R. (2002). Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiology*. Vol. 130: 549- 560.
- Perl *et al.*, 1993, citado por Alscher R., Donahue J., Cramer C. (1997).
- Perl- Treves R., Galun E. (1991). The tomato Cu, Zn Superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology*. Vol. 17 : 745- 760.
- Perl-Treves & Galun, comunicação pessoal, citado em Bowler C., Montagu M., Inzé D. (1992).
- Peterson G. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*. Vol. 83: 346-356.
- Pitcher L., Repetti P., Zilinskas B. (1994). Overproduction of ascorbate peroxidase protects transgenic tobacco plants against oxidative stress. *Plant Physiology*. Vol. 105: S-169 citado por Allen, 1995
- Polle A. (1997). Defense against photooxidative damage in plants *in* Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press:623- 655.
- Potikha T., Collins C., Johnson D., Delmer D., Levine A. (1999). The involvement of hydroxide peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiology*. Vol. 119: 849-858.

- Rao M., Paliyath G., Ormrod D. (1996). Ultraviolet-B and ozone- induced biochemical changes in antioxidante enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. Vol. 110: 125- 136.
- Raven P., Evert R., Eichhorn S. (1999). *Biology of Plants*- sixth edition. W. H. Freeman and Company. Worth Publishers.
- Rey P., Pruvot G., Becuwe N., Eymery F., Rumeau D., Peltier G. (1998). A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *The Plant Journal*. Vol. 13 : 97-107.
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J., Rodermel S., Inzé D., Mittler R. (2002). Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal*. Vol. 32 : 329- 342.
- Rizhsky L., Liang H. & Mittler R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in Tobacco. *Plant Physiology*. Vol. 130: 1143- 1151.
- Rogers K., Albert F. & Anderson J. (1988). Lipid peroxidation is a consequence of elicitor activity. *Plant Physiology*. Vol. 86: 547-553.
- Rohwer F., Fritzeimer K-H., Scheel D., Hahlbrock K. (1987). Biochemical reactions of different tissues of potato (*Solanum tuberosum*) to zoosporos or elicitors from *Phytophthora infestans*. *Planta* Vol. 170 : 556-561
- Rojas-Beltran J., Dejaeghere F., Kotb M., Du P. (2000). Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research*. Vol. 43: 383-393.
- Ross, 1961 citado por Collinge D., Borch J., Madriz-Ordenana K., Newman M-A. (2001).
- Rustérucci C., Stallaert V., Milat M-L., Pugin Alain, Ricci P., Blein J-P. (1996). Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiology*. Vol 111: 885-891.
- Ryals J., Neuenschwander U., Willits M., Molina A., Steiner H-Y., Hunt M. (1996). Systemic acquired resistance. *The plant cell*. Vol. 8: 1809- 1819.
- Ryals J., Uknes S., Ward E. (1994). Systemic Acquired resistance. *Plant Physiology*. Vol. 104: 1109- 1112.

- Salema R., Santos I. (1992). Microscópio electrónico de transmissão. Instrumentação e técnicas para material biológico. Instituto nacional de investigação científica. Lisboa.
- Salema R., Mesquita J., Santos I. (1993). Atlas de ultraestrutura celular. Porto Editora. Bloco Gráfico. Porto.
- Santos I., Almeida J., Salema R. (1999). The influence of UV-B radiation on the superóxide dismutase of maize, potato, sorghum, and wheat leaves. *Canadian journal of botany*. Vol. 77. N.º 1: 70-76.
- Scandalios J. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*. Vol. 101: 7- 12
- Scandalios J. (1997). Molecular Genetics of Superóxido in Plants *in* Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 527-565.
- Scandalios J., Guan L., Polidoros A. (1997). Catalases in plants *in* Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses Edição de Scandalios J.. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 345.- 405.
- Scandalios, 1979 citado por Scandalios J., Guan L., Polidoros A. (1997)
- Schuckelt *et al.*, 1991 citado por Willekens H., Van Camp W., Montagu M., Inzé D. Langebartels C., Sandermann H. (1994).
- Schwacke R., Hager A. (1992). Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta*. Vol. 187: 136- 141.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T. Yabuta Y., Yoshimura K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental botany*. Vol. 53. N.º 372: 1305- 1319.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Liu Q., Kasuga M., Ichimura K., Mizoguchi T., Urao T., Miyata S., Nakashima K., Shinwari Z., Abe H., Sakuma Y., Ito T., Seki M. (1999). Molecular responses to drought stress in plants: regulation of gene expression and signal transduction in Plant responses to environmental stress Edited by Smallwood M., Calvert C. & Bowles D. BIOS- scientific publishers.
- Siegel B. (1993). Plant peroxidases- an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*. Vol 12: 303-312.
- Slooten L., Van Camp W., Montagu M., Sybesma C., Inzé D. (1995). Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic Tobacco overexpressing

- manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiology*. Vol. 107 : 737- 750.
- Smartt, Simmonds. (1995). Evolution of crop plant. Second edition. Longman Scientific e Technical.
- Somssich I., Hahlbock K. (1998). Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*. Vol. 3, N.º 3: 86-90
- Taiz L., Zeiger E. (2002). Plant Physiology- third edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Tentaken R., Levine A., Brissol L., Dixon R., Lamb C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.* Vol. 92: 4158- 4163.
- Tiwari B., Belenghi B., Levine A. (2002). Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiology*. Vol. 128: 1271- 1281.
- Tsaftaris *et al.*, 1983 citado em Scandalios J., Guan L. & Polidoros A. (1997).
- Tsang E., Bowler C., Hérouart D., Camp W., Villarroel R., Genetello C, Montagu M., Inzé D. (1991). Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell*. Vol. 3: 783-792
- Tyler B. (2002) Molecular basis of recognition between Phytophthora pathogens and their hosts. *Annual Review Phytopathology*. Vol. 40 : 137-167.
- Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J-M., Botterman J., Moens T., Montagu M., Inzé D. (1999). Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 50. N.º 330: 71-78.
- Van Breusegem F., Slooten L., Stassart J-M., Moens T., Botterman J., Montagu M., Inzé D. (1999). Overproduction of Arabidopsis thaliana FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiology*. Vol. 40. N.º 515-523.
- Van Camp W., Capiou K., Montagu M., Inzé D., Slooten L. (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxido dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology*. Vol. 112: 1703-1714.
- Van Camp W., Inzé D., Montagu M. (1997). The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free radical biology & medicine*. Vol. 23. N.º 3: 515-520

- Venisse J.-S., Gullner G., Brisset M.-N. (2001). Evidence for the Involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of Pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*. Vol. 125: 2164- 2172
- Vernooij *et al.*, 1994 citado por Heil M., Bostock R. (2002).
- Vleeshouwers V., Dooijeweert W., Govers F., Kamoun S. (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*. Vol. 210: 853-864.
- Vranová E., Inzé D., Breusegem F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental Botany*. Vol. 53. N.º 53: 1227-1236.
- Wang J., Zhang H., Allen R. (1999). Overexpression of a *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiology*. Vol. 40 : 725-732
- Westcott C. (1950). Plant disease Handbook. D. Van Nostrand Company Inc.
- Willekens H., Van Camp W., Montagu M., Inzé D. Langebartels C., Sandermann H. (1994). Ozone, Sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology*. Vol. 106: 1007- 1014.
- Willekens H., Langebartels C., Tiré C., Montagu M., Inzé D., VanCamp W. (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the national academy of sciences of the U.S.A.* Vol. 91: 10450-10454.
- Willmann M. (2001). Studying the historic migrations of the Irish potato famine pathogen using ancient DNA. *Trends in Plant Science*. Vol. 6. N.º 10: 455.
- Wing T., Ouellet T., Miki B. (2002). Towards genomic and proteomic studies of protein phosphorylation in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*. Vol. 7. N.º 5.
- Wu, Shah, 1995 citado em Scandalios J., Guan L., Polidoros A. (1997).
- Wu *et al.*, 1991 citado em Foyer A. (1997).
- Wu G., Shortt B., Lawrence E., León J., Fitzsimmons K., Levine E., Raskin I., Shah D. (1997). Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiology*. Vol. 115: 427-435.
- Wu G., Wilen R., Robertson A., Gusta L. (1999). Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and

chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiology*. Vol. 120: 513- 520.

Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeru S. (2000). Expression of Spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*. Vol. 123: 223- 234.

Yu D., Liu Y., Fan B., Klessig D., Chen Z. (1997). Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiology*. Vol. 115: 343- 349.