



César Castelo Branco Esteves

Licenciado em Biologia Molecular e Genética

**Estudo dos mecanismos de resistência à antracnose em
purgueira (*Jatropha curcas*)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Doutor Luís Filipe Goulão, Investigador Auxiliar, Instituto
de Investigação Científica Tropical

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, Professora
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa

Título: Estudo dos mecanismos de resistência à antracnose em purgueira (*Jatropha curcas*)

Autor: César Castelo Branco Esteves

Contacto do autor: casteves@hotmail.com

*O conteúdo da presente dissertação é da inteira responsabilidade do autor.
Não é autorizada a cópia, total ou parcial, do conteúdo da presente dissertação.
É autorizada a citação do conteúdo da presente dissertação, desde que acompanhada da
respetiva referência bibliográfica, de acordo com as normas internacionais de citação de
trabalhos científicos.
Copyright*

“A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor”.

Agradecimentos

Quero começar por agradecer ao meu orientador, o Doutor Luís Goulão, por me ter concedido a oportunidade de realizar o estágio nos laboratórios do Instituto de Investigação Científica Tropical e desenvolver o trabalho proposto.

Um grande agradecimento à minha co-orientadora, a Doutora Ana Lúcia Leitão, pela disponibilidade, pelo rigor e exigência e por ser uma grande professora

Um especial agradecimento à Doutora Manuela Ferreira-Pinto por me ter acompanhado e ajudado na preparação de ensaios laboratoriais e por me ter facultado bibliografia preciosa.

À professora Maria José por toda a sua dedicação e trabalho em cuidar e preservar as plantas.

Agradeço ao Doutor Telmo Nunes por me ter acompanhado nas observações de microscopia electrónica.

Nunca poderei mostrar o quão grato eu estou à Burcu Belge por todo o seu apoio, pela sua ajuda, pela sua compreensão e sobretudo pela sua amizade. Sem dúvida eu teria realmente desistido sem o seu apoio. E, por isso, muito mas muito obrigado!

Também quero agradecer imenso à Sara Domingos pela disponibilidade que sempre mostrou para me ajudar e dar conselhos úteis.

Agradeço à Vânia Cardoso que, apesar do seu feito muitas vezes difícil, acabou por me ajudar na realização das tarefas laboratoriais.

Agradeço às minhas colegas de laboratório Sara Paiva, Maria Prata e Filipa Neto.

Agradeço à Dinha e à Lula por estarem sempre presentes e me terem apoiado sempre.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo investigar mecanismos de resistência à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), uma doença limitante da produção de *Jatropha curcas*, uma planta tropical que recentemente tem sido importante para a produção de biodiesel. A partir duma colecção de acessos de *J. curcas* previamente caracterizada quanto ao nível de resistência à antracnose, foram seleccionados 2 acessos que apresentaram os resultados mais contrastantes, e classificados como resistente (J49) e susceptível (J51) e acompanhada a progressão da infecção em cada um dos acessos através de microscopia electrónica de varrimento ao longo de 5 dias após a inoculação das folhas. Os resultados mostram que a percentagem de septação e germinação dos conídios no acesso resistente é aproximadamente um terço daquela no acesso susceptível.

A expressão de 14 genes candidatos, associados a mecanismos de defesa em plantas contra doenças foi quantificada em ambos acessos para investigar resposta a infecções por *C. gloeosporioides*. A expressão de genes membros da família das quitinases tipo III mostrou ser significativamente superior no acesso resistente mas esta sobreexpressão é devida de forma mais significativa ao efeito do ferimento antes da inoculação e menos como resposta à presença do patogénico. Os níveis de expressão de um gene da família das curcinas foi significativamente muito superior em amostras feridas sem inóculo, sugerindo que a presença do *C. gloeosporioides* contraria o efeito do ferimento dos tecidos foliares.

Rastreiros à resistência a outros fungos patogénicos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Stemphylium* sp. foram efectuados em 16 acessos de *J. curcas*. Os acessos responderam de forma distinta a cada fungo, apontando para que os mecanismos de defesa da planta sejam dependentes do fungo colonizador. A espécie *B. cinerea* foi aquela que provocou as mais severas lesões foliares enquanto que a *A. alternata* as menores.

Palavras-chave: antracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, expressão génica, *Jatropha curcas*, microscopia, resistência

Abstract

The aim of this work was to explore mechanisms of resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), a restricting disease in *Jatropha curcas* growth. This tropical plant has recently been used for biodiesel production. From a collection of *J. curcas* accessions previously screened for anthracnose resistance, two accessions were chosen based on the contrasting results: the most resistant accession (J49) and the most susceptible one (J51). Then the development of the infection in both accessions was followed by scanning electron microscopy over 5 days after inoculation of the leaves. The results show that the percentage of conidia germination and septation in the resistant access is approximately one third of the percentage in the susceptible one.

The expression of 14 candidate genes, linked with defense mechanisms against disease in plants was quantified in both accessions. The expression of genes of the type III chitinase family members was significantly higher in resistant accession but this overexpression is due to injury effect made prior inoculation and not in response to the presence of the pathogen. The expression levels of a gene of the curcin family were much higher in wounded samples without inoculum, suggesting that the presence of *C. gloeosporioides* reduces the effect of injury of leaf tissues.

Screenings for resistance to further fungal pathogens such as *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Stemphylium* sp. were carried out in 16 *J. curcas* accessions. The plant responded differently to each fungus, showing that plant defense mechanisms are dependent on the fungus. The species *B. cinerea* was the one that caused the most severe leaf injuries while *A. alternata* the least.

Keywords: anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, gene expression, *Jatropha curcas*, microscopy, resistance

Índice de Matérias

1. Abordagem introdutória.....	- 1 -
2. Revisão bibliográfica	- 3 -
2.1. Descrição botânica e origem.....	- 3 -
2.2. Aplicações e usos	- 5 -
2.2.1. Fixação dos solos.....	- 5 -
2.2.2. Produção de biodiesel.....	- 6 -
2.2.3. Matéria-prima para alimentação animal.....	- 8 -
2.3. Toxicidade e bioensaios com extractos de <i>Jatropha curcas</i>	- 9 -
2.4. Fungos patogénicos e doenças de plantas.....	- 9 -
2.4.1. <i>Colletotrichum</i> , agente causador da Antracnose	- 11 -
2.4.1.1 Ciclo de vida e modo de acção.....	- 12 -
2.4.2. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	- 15 -
2.4.3. <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.....	- 16 -
2.4.4. <i>Stemphylium</i> sp.....	- 17 -
2.5. Mecanismos de resistência e defesa de plantas a infecções fúngicas	- 18 -
2.5.1 Stress oxidativo	- 18 -
2.5.2. Proteínas relacionadas com a patogénese.....	- 20 -
2.5.3. Papel de enzimas degradativas da parede celular e formação de elicitadores....	- 21 -
2.5.4. Metabolitos secundários.....	- 23 -
2.6 O genoma de <i>Jatropha curcas</i>	- 24 -
3. Material e métodos.....	- 27 -
3.1. Rastreios de Resistência a Fungos em Folhas de <i>Jatropha curcas</i>	- 27 -
3.1.1. Material vegetal	- 27 -
3.1.2. Preparação dos meios de cultura.....	- 27 -
3.1.3. Preparação dos isolados de fungos e dos inóculos.....	- 27 -
3.1.4. Condições de inoculação	- 27 -
3.1.5. Avaliação da progressão dos sintomas	- 28 -
3.2. Acompanhamento da progressão da infecção da antracnose por microscopia em folhas de <i>Jatropha curcas</i>	- 29 -
3.2.1. Preparação e inoculação do material vegetal	- 29 -
3.2.2. Observação por microscopia óptica.....	- 30 -
3.2.3. Observação por microscopia electrónica de varrimento.....	- 30 -
3.3. Quantificação da expressão de genes de <i>J. curcas</i> em resposta à infecção por <i>C. gloeosporioides</i>	- 31 -
3.3.1. Tratamento, recolha e preparação das amostras	- 31 -
3.3.2. Extracção do RNA.....	- 31 -

3.3.3. Electroforese em gel de Agarose	- 32 -
3.3.3.1. <i>Preparação do gel</i>	- 32 -
3.3.3.2. <i>Electroforese</i>	- 32 -
3.3.4. Purificação do RNA	- 32 -
3.3.5. PCR	- 33 -
3.3.6. Quantificação do RNA/DNA	- 33 -
3.3.7. Síntese de cDNA	- 33 -
3.3.8. Escolha de genes, desenho e cálculo da eficiência de amplificação dos <i>primers</i> -	34 -
3.3.9. Expressão génica por PCR em tempo real (qRT-PCR).....	- 36 -
4. Resultados.....	- 37 -
4.1. Acompanhamento da progressão da infecção através de microscopia	- 37 -
4.2. Expressão de genes candidatos à resistência à antracnose	- 46 -
4.3. Rastreio de Resistência a diferentes fungos em folhas de <i>J. curcas</i>	- 60 -
5. Discussão	- 69 -
6. Considerações finais	- 81 -
6.1. Conclusões.....	- 81 -
6.2. Perspectivas futuras.....	- 82 -
7. Referências bibliográficas	- 83 -

Índice de Figuras

Figura 2.1 Aspecto macroscópico de <i>Jatropha curcas</i>	4
Figura 2.2 Mapa mostrando uma comparação dos limites de cultivo de <i>Jatropha curcas</i> e de <i>Elaeis guineensis</i>	5
Figura 2.3 Esquema geral da reacção de transesterificação dos óleos vegetais.....	8
Figura 2.4 Sintomas de doenças provocadas por espécies de <i>Colletotrichum</i>	12
Figura 2.5 Ciclo da antracnose na manga (<i>Mangifera indica</i>).....	13
Figura 2.6 Estruturas de infecção de <i>Colletotrichum graminícola</i>	14
Figura 2.7 Conidióforo com conídios maduros de <i>B. cinerea</i>	15
Figura 2.8 Aspecto de esporos de <i>Alternaria alternata</i> em vários estágios de desenvolvimento, com formação de vários septos, observados em microscopia óptica...	16
Figura 2.9 Aspecto dos esporos nos estados teleomorfo e anamorfo.....	17
Figura 2.10 Espécies reactivas de oxigénio e o mecanismo de defesa antioxidante.....	19
Figura 4.1 Aspecto geral da infecção ao longo do tempo observado ao redor da lesão das folhas dos 2 Acessos de <i>J. curcas</i> testados, observado por microscopia óptica.....	38
Figura 4.2 Aspecto geral da infecção ao longo do tempo observado ao redor da lesão das folhas dos 2 acessos de <i>J. curcas</i> testados, observado por microscopia electrónica de varrimento.....	39
Figura 4.3 Aspecto da disposição dos esporos ao longo da ferida.....	40
Figura 4.4 Padrão de disposição dos esporos na superfície da folha.....	40
Figura 4.5 Pormenor do aspecto dos esporos.....	41
Figura 4.6 Aspecto do desenvolvimento dos conídios ao longo do processo de infecção..	42
Figura 4.7 Percentagem de conídios septados observados nos acessos J49 J51, 24 e 120 horas após a inoculação.....	44
Figura 4.8 Percentagem de germinação observada nos acessos J49 e J51, 24 e 120 horas após a inoculação.....	44
Figura 4.9 A e B Observação do comportamento das hifas em relação aos estomas.....	45
Figura 4.10 Aspecto dos apressórios.....	46
Figura 4.11 Expressão relativa do gene <i>Curcina "a"</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	51
Figura 4.12 Expressão relativa do gene <i>Curcina "b"</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	52
Figura 4.13 Expressão relativa do gene <i>Quitinase III "a"</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	54
Figura 4.14 Expressão relativa do gene <i>Quitinase III "b"</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	55
Figura 4.15 Expressão relativa do gene <i>JcPR-10a</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	56
Figura 4.16 Expressão relativa do gene <i>JcPR-b</i> em amostras de folhas de 2 acessos de	

<i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	57
Figura 4.17 Expressão relativa do gene <i>cAPX</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	58
Figura 4.18 Expressão relativa do gene <i>tAPX</i> em amostras de folhas de 2 acessos de <i>J. curcas</i> , recolhidas ao longo de 72 horas de incubação.....	59
Figura 4.19 Exemplos do aspecto macroscópico de folhas destacadas de <i>J. curcas</i> apresentando as lesões resultantes da inoculação pelos fungos, <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Stemphylium</i> sp., ao fim de 7 dias de incubação a 22°C.....	61
Figura 4.20 Severidade da Doença, em percentagem, resultante da inoculação com <i>Alternaria alternata</i> em folhas de 16 acessos de <i>J. curcas</i> , ao fim de 7 dias de incubação..	63
Figura 4.21 Severidade da Doença, em percentagem, resultante da inoculação com <i>Botrytis cinerea</i> em folhas de 16 acessos de <i>J. curcas</i> , ao fim de 7 dias de incubação.....	64
Figura 4.22 Severidade da Doença, em percentagem, resultante da inoculação com <i>Stemphylium</i> sp. em folhas de 16 acessos de <i>J. curcas</i> , ao fim de 7 dias de incubação.....	65
Figura 4.23 Análise de componentes principais (PCA) com os dados das lesões provocadas por todos os fungos usados a todos os acessos de <i>J. curcas</i> testados.....	67

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 Exemplos de aplicações de diferentes partes da planta de <i>J. curcas</i>	5
Tabela 2.2 Composição em ácidos gordos do óleo de <i>Jatropha curcas</i>	7
Tabela 2.3 Comparação de propriedades de combustíveis.....	7
Tabela 2.4 Resumo da classificação de proteínas relacionadas com a patogênese e as suas propriedades.....	21
Tabela 3.1 Lista e origem dos acessos de <i>Jatropha curcas</i> usados nos ensaios e respectiva classificação de nível de resistência à antracnose, avaliada de acordo com Ferreira-Pinto e colaboradores (2011).....	29
Tabela 3.2 Lista de genes de referência usados.....	34
Tabela 3.3 Lista de genes de interesse pesquisados.....	35
Tabela 4.1 Dimensões dos conídios observados nas amostras recolhidas ao fim de 24 horas após a inoculação em ambos acessos.....	41
Tabela 4.2 Lista de <i>primers</i> usados e as eficiências obtidas.....	47
Tabela 4.3 Lista de <i>primers</i> usados para os genes da <i>curcina</i> “c” e <i>JcPR-c</i>	48
Tabela 4.4 Lista de <i>primers</i> de quitinases usados que não se expressam em folhas.....	48
Tabela 4.5 Lista de <i>primers</i> dos genes de referência e as eficiências obtidas.....	49
Tabela 4.6 Ct de amostras com 150 ng de DNA recolhidas sem incubação, tempo 0, correspondente à expressão basal para cada gene.....	49
Tabela 4.7. Percentagem de infecção (N=3x3) e o diâmetro (média ± desvio padrão) da lesão resultante da inoculação com os fungos usados (<i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Stemphylium sp.</i>) em folhas de 16 acessos de <i>J. curcas</i> , ao fim de 7 dias de incubação.....	62
Tabela 4.8 Resumo da classificação de cada acesso de <i>J. curcas</i> testado quanto ao tipo de tolerância para os 4 fungos usados, <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Stemphylium sp.</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	65
Tabela 5.1 Informação recolhida na bibliografia referente a <i>rastreios</i> de resistência recolhida.....	72
Tabela 5.2 Resultados de observações microscópicas da literatura consultada.....	77

Lista de abreviaturas e siglas

Ap – apressório
APX – peroxidase de ascorbato
cAPX - peroxidase de ascorbato citossólica
CAT - catalase
Co – conídio
C_t – ciclo do limiar de detecção (*cycle threshold*)
DHA – dehidroascorbato
DHAR - Redutase de dehidroascorbato
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT – Ditiotreitól
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH - gliceraldeído fosfato dehidrogenase
GPX - Peroxidase de glutationa
GR – Redutase de glutationa
GSH – glutationa
GSSG - dissulfeto de glutationa
GT – tubo germinativo
HRGP - glicoproteínas ricas em hidroxiprolina
IICT – Instituto de Investigação Científica Tropical
LRR - repetição rica em leucina
mAPX - peroxidase de ascorbato do peroxissoma
MDHA - monodehidroascorbato
MDHAR – redutase de monodehidroascorbato
mitAPX- peroxidase de ascorbato mitocondrial
MR – moderadamente resistente
pb – pares de base
PC – Componente principal
PCA - Análise de Componentes Principais
PDA - agar de batata dextrosada
PGIP - proteínas inibidoras da poligalacturonase
PR - proteínas relacionadas com a patogénese
PX - peroxidases
R – resistente
RIP – Proteína inibidora de ribossoma
ROS - espécies reactivas de oxigénio
S – susceptível
sAPX - peroxidase de ascorbato do estroma do cloroplasto
SAR – resistência sistémica adquirida
SOD - dismutase de superóxido
SSTE - dodecilsulfato de sódio-Tris-HCl-EDTA
TAE - Tris-acetato-EDTA
tAPX - peroxidase de ascorbato tilacoidal
TUB5 - beta tubulina-5

1. Abordagem introdutória

A purgueira (*Jatropha curcas* L.) tem assumido recentemente grande interesse para utilização na produção de biodiesel, tirando partido do alto conteúdo de óleo das suas sementes. Embora existam variedades comestíveis, a maioria é tóxica devido ao elevado conteúdo de ésteres de forbol, que provoca irritação da pele e é considerado cancerígeno. Contudo, a torta, subproduto restante da extracção do óleo, poderá ser aproveitada para alimentação de gado, dependendo do sucesso de processos industriais de desintoxicação. O elevado interesse económico revelado por esta espécie aconselha assim que se compreenda a sua fisiologia de modo a melhorar as suas práticas de cultivo, de forma economicamente e ambientalmente sustentáveis. A antracnose provocada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é uma das doenças mais devastadoras para a purgueira, sendo responsável pelo desenvolvimento de manchas foliares que culminam em necrose dos tecidos infectados. O Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT) mantém uma colecção de plantas e sementes de diferentes genótipos de *J. curcas* com origem em diversas proveniências geográficas. Estas diferentes variedades ou genótipos encontram-se caracterizadas quanto à sua susceptibilidade contra o *C. gloeosporioides* a nível foliar, conhecendo-se assim quais os acessos mais resistentes e susceptíveis a este fungo patogénico.

Este trabalho visa contribuir para esclarecer alguns aspectos da fitopatologia da antracnose em *J. curcas* causada pelo fungo *C. gloeosporioides*. Mais concretamente, compreender melhor os mecanismos de resposta usados pelo hospedeiro para se defender deste agente patogénico, através da concretização de 3 tarefas, usando genótipos com potencial de resistência contrastante no que diz respeito à sua susceptibilidade a este fungo:

- 1) Acompanhamento da progressão da infecção de *C. gloeosporioides* em folhas de *J. curcas*, através de visualização por microscopia óptica e electrónica de varrimento;
- 2) Identificação e quantificação da expressão de genes de famílias candidatas a estarem envolvidos nos mecanismos de resistência à infecção por *C. gloeosporioides* em *J. curcas*, através de PCR quantitativo em tempo-real (qrRT-PCR). Foram seleccionados genes de 3 curcinas, 3 proteínas relacionadas com a patogénese, de 2 peroxidases de ascorbato e 6 quitinases do tipo III;
- 3) Investigação da resistência contra fungos de outras famílias, nomeadamente *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Stemphylium* sp., através de ensaios de inoculação controlada, em folhas destacadas de *J. curcas*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Descrição botânica e origem

A espécie *Jatropha curcas* pertence à família *Euphorbiaceae* e é conhecida comumente como purgueira em Portugal, pinhão-manso no Brasil e *physic/fig/pig nut* nos países anglo-saxónicos (Rakshit *et al.*, 2010).

A família *Euphorbiaceae* compreende 317 géneros e cerca de 8000 espécies e é predominantemente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais (Tokuoka & Tobe, 1995). Além da purgueira, esta família inclui outras espécies de importância económica como a mamona / rícino (*Ricinus communis* L.), a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e a seringueira / árvore-da-borracha (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Muitas euforbiáceas são venenosas por ingestão e podem causar dermatite (Jones & Luchsinger, 1987).

O género *Jatropha* inclui cerca de 175 espécies (Mukherjee *et al.*, 2011; Rakshit *et al.*, 2010) que se destacam pelo seu rápido crescimento, fácil propagação e pelo alto teor de óleo das suas sementes (Pabon & Hernandez-Rodriguez, 2012). O nome de *Jatropha* deriva das palavras gregas "*jatros*" (médico) e "*trophe*" (alimentos), o que remete para os seus usos medicinais (Sabandar *et al.*, 2013) e foi Lineu o responsável por esta classificação no seu livro "*Species Plantarum*" em 1753 (Kumar & Sharma, 2008).

A purgueira é uma árvore pequena ou um arbusto grande (Kumar & Sharma, 2008) (Figura 2.1 A), apresenta uma longevidade que pode chegar aos 50 anos e pode atingir até 5-7 m de altura (Basili & Fontini, 2012).

As folhas (Figura 2.1 A) são alternadas, palmadas, pecioladas, estipuladas e têm 3 a 5 conjuntos de lóbulos com filotaxia espiral. Os frutos (Figura 2.1.B) são geralmente produzidos na estação das chuvas (Devappa *et al.*, 2011). A planta é monóica e as suas flores (Figura 2.1.C) são geralmente unissexuais e polinizadas por insectos, especialmente abelhas. Normalmente, cada plântula origina 5 radículas: uma central e 4 periféricas (ver Figura 2.1.D). Em plantas propagadas vegetativamente, geralmente, forma-se apenas uma raiz (Kumar & Sharma, 2008).

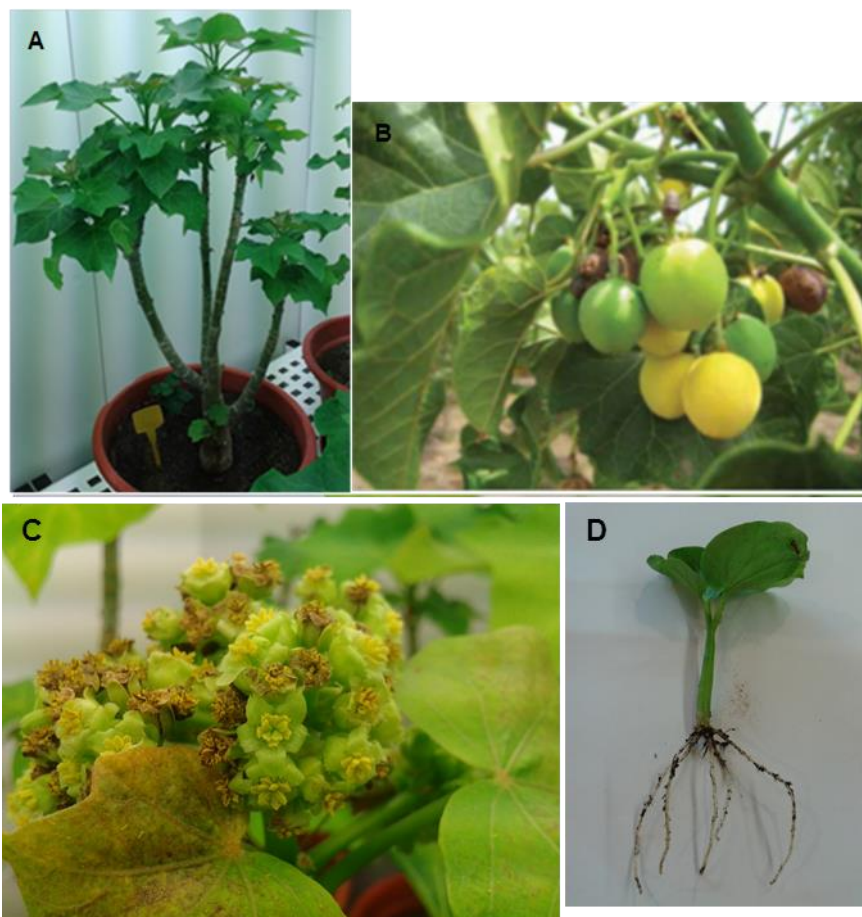


Figura 2.1. – Aspecto macroscópico de *Jatropha curcas*. A - Planta adulta em estufa; B - Frutos de *Jatropha* em diferentes estágios de maturação (FAO, 2010); C - Flores de *J. curcas*; D - Plântula apresentando 5 radículas.

A *J. curcas* cresce em regiões tropicais e subtropicais com limites de cultivo a 30° Norte e 35° Sul (Figura 2.2) e em altitudes menores de 500 metros acima do nível do mar (FAO, 2010). Os limites de latitude para o cultivo de *J. curcas* são muito superiores aos da árvore de óleo de palma (*Elaeis guineensis* Jacq.) também uma planta tropical, cujo óleo também é usado em parte para produção de biodiesel (Schwaiger *et al.*, 2011). A *J. curcas* é originária da América central e, de acordo com Divakara e colaboradores (2010), terá sido levada para África por exploradores portugueses, nomeadamente para Cabo Verde e Guiné Bissau. Actualmente encontra-se abundantemente distribuída em muitas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América.



Figura 2.2 – Mapa mostrando uma comparação dos limites de cultivo de *Jatropha curcas* e de *Elaeis guineensis* Adaptado de FAO (2010) e Schwaiger e colaboradores (2011).

2.2. Aplicações e usos

As plantas da espécie *Jatropha curcas* são consideradas multi-usos (Tabela 2.1). As primeiras aplicações comerciais para esta espécie foram registadas em Lisboa, onde o óleo proveniente de Cabo verde era usado para a produção de sabão e para a iluminação pública da cidade (Gübitz *et al.*, 1999).

Tabela 2.1 – Exemplos de aplicações de diferentes partes da planta de *J. curcas* (Gübitz *et al.*, 1999).

<i>Jatropha curcas</i>				
<ul style="list-style-type: none"> ➢ Controlo da erosão (fixação dos solos); <ul style="list-style-type: none"> ➢ Sebe; ➢ Lenha. 				
Frutos	Sementes	Cascas da fruta	Folhas	Latex
<ul style="list-style-type: none"> ➢ Óleo ➢ Produção de sabão; ➢ Combustível; ➢ Insecticida; ➢ Usos medicinais. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Torta ➢ Fertilizante; ➢ Produção de biogás; ➢ Ração animal (variedade não tóxica/desintoxicada). 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Cascas da semente ➢ Combustíveis. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Desenvolvimento do bicho-da-seda; ➢ Usos medicinais; ➢ Substâncias anti-inflamatórias. 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Protease cicatrizante (curcaína); ➢ Usos medicinais.

2.2.1. Fixação dos solos

A purgueira é conhecida pela sua capacidade de crescer em “solos marginais” descritos genericamente como terrenos pouco adequados para uso agrícola. Sendo uma planta perene, desenvolve raízes profundas que ajudam a manter a qualidade dos solos e a gerir a água e

nutrientes mais conservadoramente, contribuindo ainda para a redução da erosão (King *et al.*, 2009; Basili & Fontini, 2012).

2.2.2. Produção de biodiesel

Biocombustíveis são todos os combustíveis derivados de fontes orgânicas não fósseis e incluem o biodiesel, o bio-etanol e o bio-butano. O uso de biocombustíveis, substituindo o uso de combustíveis fósseis, tem como principal objectivo contrariar o aumento de gases de efeito de estufa na atmosfera, nomeadamente o dióxido de carbono (Kohse-Höinghaus *et al.*, 2010). A produção e o uso de biocombustíveis também são promovidos com a finalidade de reduzir a dependência de petróleo importado em países não produtores do mesmo. Adicionalmente, para os países em desenvolvimento, é visto também como um meio de aumentar as receitas nas exportações e criar novas oportunidades de emprego (Schwaiger *et al.*, 2011).

Os biocombustíveis são percebidos como neutros em termos de emissão de gases com efeito de estufa, pois o carbono libertado na queima do combustível seria contrabalançado pelo carbono fixado durante o crescimento da planta. No entanto, do ponto de vista de sustentabilidade ambiental, salienta-se que os biocombustíveis de 1ª geração são cultivados em terrenos de florestas tropicais, implicando frequentemente o abate e redução das mesmas (Basili & Fontini, 2012). Adicionalmente, os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de culturas alimentícias levando ao aumento dos preços dos bens alimentares (Sims *et al.*, 2010). Assim, surgiu o interesse no desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração, produzidos a partir de biomassa não alimentícia (Sims *et al.*, 2010).

A *J. curcas* é uma espécie ideal para a produção de biocombustíveis de segunda geração, representando uma alternativa às plantações de açúcar de cana (com importância no Brasil), de milho (com importância nos EUA) e de óleo de palma (com importância no sudeste asiático) que aceleram a desflorestação e provocam o aumento dos preços dos alimentos, pois não compete directamente com a produção de alimentos (Basili & Fontini, 2012).

Dentro da categoria de biocombustíveis, o biodiesel é definido como sendo ésteres mono-acil de óleos vegetais ou gorduras animais (Knothe, 2005).

A *J. curcas* tem um rendimento médio de aproximadamente 2000 litros de biocombustível por hectare que é, em comparação com o óleo de palma (*Elaeis guineensis*), menos de metade. Tem, no entanto, um intervalo de latitudes consideradas adequadas ao seu cultivo muito maior daquele do óleo de palma (ver Figura 2.2) e o preço de produção do biodiesel de *Jatropha* na Índia é aproximadamente 0,3 €/litro, inferior ao óleo de palma, cifrando-se em aproximadamente 0,35 €/litro (Schwaiger *et al.*, 2011).

O teor de óleo presente nas sementes de *J. curcas* varia entre 30% a 50% em peso, enquanto no miolo o conteúdo de óleo é maior e varia entre os 45% e os 60% (Basili & Fontini, 2012). O óleo apresenta cerca de 70% de ácidos gordos insaturados, predominantemente o ácido oleico, seguido do ácido linoleico (Tabela 2.2.) (Parawira, 2010). A presença de ácidos gordos insaturados (com índice de iodo elevado) permite que o óleo permaneça fluido a temperaturas

baixas, ainda que o óleo fique mais propenso à oxidação durante o armazenamento e a baixa concentração de ácidos gordos livres aumenta a capacidade de armazenamento (FAO, 2010).

Tabela 2.2. – Composição em ácidos gordos do óleo de *Jatropha curcas* (Gübitz *et al.*, 1999).

Ácido gordo		%
14:0	Ácido mirístico	0-0,1
16:0	Ácido palmítico	14,1-15,3
18:0	Ácido esteárico	3,7-9,8
20:0	Ácido eicosanóico	0-0,3
22:0	Ácido beénico	0-0,2
16:1	Ácido palmitoleico	0-1,3
18:1	Ácido oleico	34,3-45,8
18:2	Ácido linoleico	29,0-44,2
18:3	Ácido linolénico	0-0,3

O óleo bruto de *J. curcas* é considerado viscoso, porém o processamento do óleo reduz significativamente a sua viscosidade (Tabela 2.3) (Parawira, 2010). Considera-se que o biodiesel de *J. curcas* cumpre os parâmetros europeus de qualidade (FAO, 2010). Algumas propriedades do óleo bruto extraído de *J. curcas*, do biodiesel produzido a partir do óleo de *J. curcas* e do diesel fóssil são comparadas na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Comparação de propriedades de combustíveis: óleo de *Jatropha* sem processamento, biodiesel obtido a partir do óleo de *Jatropha*, biodiesel fóssil e padrões de qualidade (Parawira, 2010).

Propriedade	Óleo de <i>Jatropha</i>	Biodiesel de <i>Jatropha</i>	Diesel fóssil	Padrões de Biodiesel	
				AST D 6751-02	DIN EN 14214
Densidade (15° C, kg/m ³)	940	880	850	-	860 - 900
Viscosidade (mm ² /s)	24,5	4,8	2,6	1,9 – 6,0	3,5 – 5,0
Ponto de fulgor (°C)	225	135	68	>130	>120
Humidade (%)	1,4	0,025	0,02	<0,03	<0,05
Cinzas (%)	0,8	0,012	0,01	<0,02	<0,02
Resíduo de carbono (%)	1,0	0,20	0,17	-	<0,30
Valor acidez (mgKO/Hg)	28,0	0,40	-	<0,80	<0,50
Valor calórico (MJ/kg)	38,65	39,23	42,00	-	-

O processamento, após a compressão e extração do óleo das sementes, envolve a reação de transesterificação, em que o óleo vegetal bruto é convertido em biodiesel (Figura 2.3). A esterificação separa os ácidos gordos do glicerol e liga-os a um álcool, substituindo a molécula

de glicerol. O metanol de origem de combustível fóssil é o álcool mais usado e o hidróxido de sódio ou de potássio são os catalisadores mais comuns. O composto resultante é o éster de metil de ácidos gordos (FAME) (Schuchardt *et al.*, 1998). Como resíduos, a torta que sobra, sendo rica em proteína e fibra pode servir como ração animal (Schwaiger *et al.*, 2011), como referido anteriormente e o glicerol que pode ser usado em outras indústrias, com aplicações em cosméticos, fármacos, dentífricos, alimentos, plásticos, explosivos, etc (Schuchardt *et al.*, 1998).



Figura 2.3 – Esquema geral da reacção de transesterificação dos óleos vegetais. Adaptado de Schuchardt *et al.*, 1998.

2.2.3. Matéria-prima para alimentação animal

Embora o óleo seja mais valioso, não é de descartar a possibilidade de explorar a planta e rentabilizar o uso da torta, um subproduto da extração do óleo da semente, como um bem alimentar para o gado. No entanto, a elevada toxicidade das sementes impede que seja actualmente usada para alimentação animal (King *et al.*, 2009). As sementes da purgueira para além de boas fontes de óleo são também ricas em proteínas, apresentando conteúdos na ordem dos 170-200 g/kg, apresentando um bom equilíbrio de aminoácidos essenciais, excepto para a lisina que se encontra em baixas quantidades. Assim, o uso da torta para alimentação animal necessitaria de suplementação com monohidroclorido de lisina na dieta para compensar a deficiência neste aminoácido (Makkar *et al.*, 2012).

No entanto, a sua utilização comestível é limitada pela presença de factores tóxicos e antinutricionais (Devappa *et al.*, 2011). As plantas desta espécie produzem um largo número de metabolitos secundários com propriedades antinutricionais e tóxicas, sendo que a maioria dos quais são produzidos como mecanismos de defesa contra predadores e patogénicos e como meio de defesa contra danos celulares induzidos por condições ambientais adversas (Devappa *et al.*, 2011).

As sementes da purgueira contêm factores antinutricionais dos quais se destacam inibidores de tripsina, lectina, saponina e ácido fítico para além de compostos tóxicos como os ésteres de forbol e a curcina (Srivastava *et al.*, 2012). Nas sementes, a maioria do ácido fítico (96,5%), do inibidor de tripsina (95,3%) e dos ésteres de forbol (85,7%) estão localizados no endosperma

(Devappa *et al.*, 2011). A concentração de ésteres de forbol nas sementes totaliza 2,00 – 6,00 mg/g e nas folhas 1,83 – 2,75 mg/g (Makkar *et al.*, 2012).

Existem trabalhos de investigação que visam obter genótipos de *J. curcas* adaptados à utilização alimentar. Patade e colaboradores (2014) estão a produzir plantas transgénicas onde usam um RNA de interferência para silenciar a expressão de um gene codificante para curcina para obter uma variedade de *J. curcas* não tóxica. Os autores acrescentam que vários métodos de extracção que incluem solventes orgânicos polares e/ou tratamentos térmicos e/ou com NaHCO₃ têm sido propostos para a desintoxicação da torta, ainda sem resultados totalmente satisfatórios e que métodos economicamente viáveis para aplicar em larga escala estão ainda em fase de desenvolvimento.

2.3. Toxicidade e bioensaios com extractos de *Jatropha curcas*

A toxicidade presente nas sementes de *Jatropha curcas* é atribuída à presença de ésteres de forbol (Devappa *et al.*, 2012).

As actividades antimicrobianas, moluscidas e fungicidas de fracções enriquecidas em ésteres de forbol isoladas de *J. curcas* foram demonstradas em diversas espécies (Devappa *et al.*, 2012). Entre os fungos testados, as espécies *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme* foram assinalados como os mais susceptíveis, com valores de EC₅₀ iguais a 63, 44 e 47 µg/mL, respectivamente; as 3 espécies de fungos registaram uma inibição total do seu crescimento com uma concentração de 114,6 µg/mL da fracção enriquecida em ésteres de forbol.

Noutro estudo, que testava a actividade antifúngica do óleo extraído de sementes de *J. curcas*, concluiu-se que este óleo apresenta efeito efectivo também contra fungos transmitidos por sementes. Entre os fungos testados, as espécies de *Aspergillus* foram as que demonstraram a maior inibição do seu crescimento; já a espécie *Alternaria alternata* apresentou uma inibição de 34,64% e 48,25%, ao fim de 24 horas e 96 horas, respectivamente, quando usado 500 µL de óleo sem diluição (Srivastava *et al.*, 2012).

Sugere-se então que o efeito fungicida, antimicrobiano, moluscida e insecticida de extractos isolados de *J. curcas* podem ter aplicações na agricultura e na farmacologia.

2.4. Fungos patogénicos e doenças de plantas

Os danos causados por fungos em espécies de interesse agrícola são causadores de enormes prejuízos, primordialmente pelos seguintes motivos: os fungos esporulam prolificamente, fornecendo inóculo para infectar outras plantas; o período latente entre a infecção e a produção de esporos pode ser de alguns dias; os esporos se humidificados, podem espalhar-se num inóculo altamente denso e, se desidratados, podem ser transportados em longas distâncias pelo vento; produzem compostos fitotóxicos ou enzimas que destroem as células vegetais;

retiram nutrientes às partes valiosas da planta e reduzem os rendimentos (Strange & Scott, 2005).

Apesar da *J. curcas* ser considerada uma espécie com alta resistência a *stresses* bióticos, o cultivo num padrão intensivo e monocultural propicia o ataque de pragas e doenças (Ginting & Maryono, 2009).

Ainda não são conhecidos todos os agentes patogénicos que atacam a purgueira, porém nos últimos anos, alguns trabalhos (e.g. Vanzolini *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2011; Usha & Rekha, 2012) têm procurado identificar em folhas e sementes vários fungos que fazem parte da microbiota normal e os possíveis agentes patogénicos causadores de algumas doenças conhecidas e emergentes.

Num estudo comparativo dos fungos presentes na superfície das folhas entre o verão e o inverno na Índia, registou-se um total de 25 espécies de fungos, sendo que 7 eram comuns a ambas as estações e 9 restringiam-se a cada uma das estações, dado que o seu crescimento mostrou ser afectado pela temperatura e humidade (Usha & Rekha, 2012). A *Alternaria alternata* foi a espécie mais abundante durante as 2 estações.

Segundo Kumar & Kaushik (2013) fungos endofíticos, aqueles que vivem dentro da planta sem causar dano, contribuem para a protecção do hospedeiro contra pragas e doenças. Assim, estes autores identificaram em folhas da purgueira colhidas em Nova Déli, Índia, o fungo endofítico predominante *Colletotrichum truncatum* que era efectivo contra os fungos patogénicos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotium*.

O aumento do interesse pela purgueira, desencadeou uma crescente procura pelas suas sementes que necessitam apresentar boa qualidade fisiológica. Vanzolini e colaboradores (2010) identificaram em sementes recolhidas em São Paulo, Brasil, uma alta frequência de espécies fúngicas e que o género *Cladosporium* sp. (92%) era aquele que apresentava uma maior incidência, sendo seguido pelos géneros *Alternaria* sp. (76%), *Fusarium* spp. (62%), *Colletotrichum gloeosporioides* (42,5%), *Epicoccum* sp. (31%), *Macrophomina* sp. (11%), *Nigrospora* sp. (11%), *Helminthosporium* sp. (9,5%), *Pestalotiopsis* sp. (4,5%) e *Phoma* sp. (3,5%). Os mesmos autores concluíram ainda que a desinfecção superficial das sementes com hipoclorito de sódio surtiu pouco efeito na incidência dos fungos. Kobayashi e colaboradores (2011) chegaram a conclusões semelhantes e identificaram um total de 19 espécies fúngicas, entre as quais fungos saprófitas, sempre presentes nas sementes, como *Acremonium* sp., *Chaetomium* sp., *Curvularia* sp., *Periconia* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., *Trichothecium* sp. e *Absidia* sp. que podem afectar o vigor destas. Sá e colaboradores (2011) concluem que o tegumento da semente da purgueira funciona como barreira física natural que impede a penetração/infecção dos patogénicos nas sementes; sendo que os fungos, entre os agentes patogénicos, são os que têm maior aptidão em penetrar directamente nos tecidos vegetais e se alojarem internamente.

2.4.1. *Colletotrichum* spp., agente causador da Antracnose

Vários agentes patogénicos pertencem ao género *Colletotrichum* provocando doenças numa larga variedade de plantas lenhosas e herbáceas, e apresentando uma distribuição geográfica tropical e subtropical, embora também possam afectar algumas culturas de regiões temperadas. Os exemplos vão desde frutos como o morango, citrinos, manga, abacate, banana e bagas de café até cereais como milho, cana-de-açúcar e sorgo (Freeman *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2012).

Numa lista com o “Top 10 de fungos fitopatogénicos” criada para o jornal *Molecular Plant Pathology*, o género *Colletotrichum* é colocado em 8º lugar, baseando-se na importância científica e económica do ponto de vista dos contribuidores da revista (Dean *et al.*, 2012). O número proposto de espécies pertencentes ao género *Colletotrichum* varia desde 29 a 700 dependendo da interpretação e dos critérios taxonómicos, sendo a sua sistemática presentemente descrita como um “estado de fluxo” (Dean *et al.*, 2012).

A taxonomia destes fungos permanece assim ainda amplamente indefinida. Pelo menos 11 sinónimos genéricos foram descritos e existem cerca de 900 espécies descritas como *Colletotrichum*. Apenas para a espécie, *C. gloeosporioides*, a mais ubíqua de todas as espécies, foram já citados 600 sinónimos. Esta espécie está disseminada por quase todas as regiões do mundo e observa-se um largo espectro de hospedeiros que podem ser também específicos para uma determinada espécie vegetal ou cultivar. Este agente patogénico pode provocar danos em várias partes da planta, desde raízes, caules, folhas, flores até aos frutos, mas são frequentemente muito específicos para tecidos individuais (Sutton, 1992). Tipicamente, os sintomas da antracnose (Figura 2.4.) incluem lesões necróticas limitadas, muitas vezes afundadas, nas folhas, caules, flores e frutas (Freeman *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 2012).

Virtualmente todas as culturas cultivadas no mundo são susceptíveis a uma ou mais espécies de *Colletotrichum* (Dean *et al.*, 2012). De salientar que a antracnose causada pelo *C. gloeosporioides* é a principal doença fúngica na mandioca (Strange & Scott, 2005), tal como a purgueira, também ela uma euforbiácea.

O teleomorfo *Glomerella cingulata* é como a espécie é conhecida no estágio sexuado mas muitas estirpes de *C. gloeosporioides* são presumivelmente incapazes de reprodução sexuada (Cisar & TeBeest, 1999).

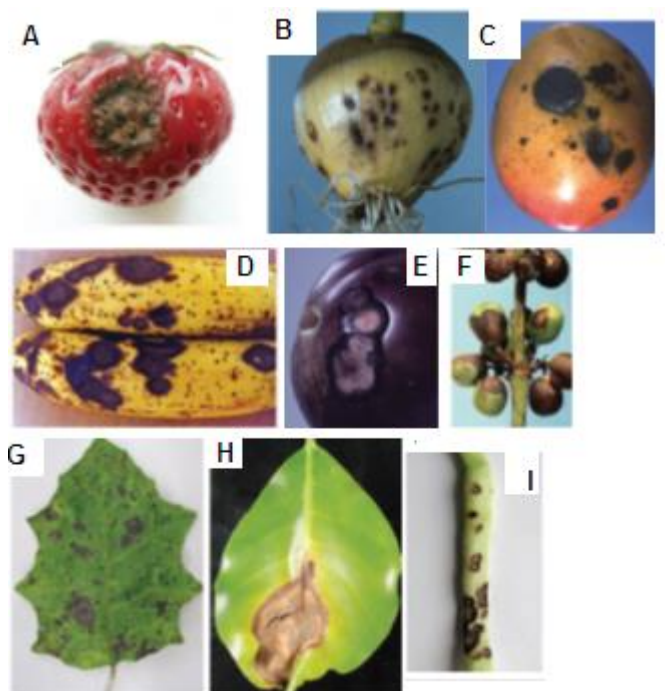


Figura 2.4. – Sintomas de doenças provocadas por espécies de *Colletotrichum*: A - Antracnose no morango B – Antracnose na cebola; C- Antracnose na manga; D- Antracnose na banana; E - Antracnose no fruto de beringela (*Solanum melongena*); F - Antracnose em bagas de café; G – Mancha foliar em *Brachyglottis repanda*; H - Antracnose nas folhas de *Tecomathe*; I – Antracnose no feijão. Adaptado de Cannon e colaboradores (2012)

2.4.1.1 Ciclo de vida e modo de acção

Os esporos são produzidos nos acérvulos (Figura 2.5) de folhas doentes, nos ramos terminais, em inflorescências mumificadas e, de acordo com Silva & Michereff (2013), a principal fonte de inóculo nos frutos é proveniente das próprias folhas infectadas. Em condições de elevada humidade, sobretudo na presença de chuva, os esporos são libertados e disseminados, atingindo as flores ou os frutos imaturos. A infecção de *Colletotrichum* tem implicações pós-colheita em frutos por causa do fenómeno da quiescência, um tipo de infecção que se inicia numa fase pré-colheita durante o desenvolvimento das flores e dos frutos. Apenas com o amadurecimento do fruto, quando existe um pico de produção da hormona de amadurecimento, o etileno, os sintomas da antracnose surgem (Silva & Michereff, 2013).

O fungo *Colletotrichum* apresenta dois mecanismos para obtenção dos nutrientes: na fase *biotrófica*, os nutrientes são obtidos das células vivas do hospedeiro; enquanto que na fase *necrotrófica*, os nutrientes são obtidos a partir das células mortas do hospedeiro, destruídas pelo fungo. Esta última fase é induzida aquando a maturação e senescência dos frutos. O período que compreende a infecção do hospedeiro e o desenvolvimento do fungo e a expressão dos sintomas é designado por fase quiescente (Prusky & Lichter, 2007).

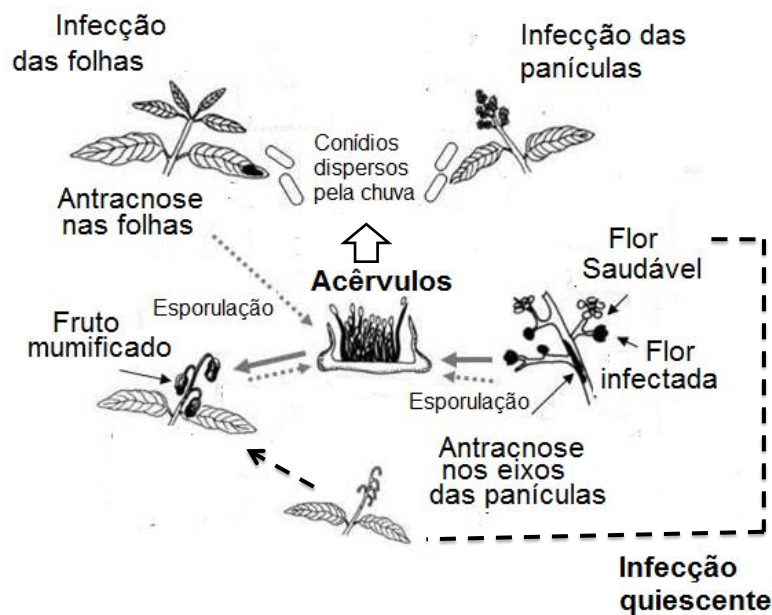


Figura 2.5. - Ciclo da antracose na manga (*Mangifera indica*). Adaptado de Silva & Michereff (2013).

2.4.1.1.1 Penetração na superfície dos tecidos vegetais

As espécies de *Colletotrichum* penetram as superfícies das plantas de vários modos:

- a) Por aberturas naturais como os estomas;
- b) Por penetração directa através da barreira cuticular;
- c) Através de feridas provocadas por agentes bióticos e/ou abióticos.

A penetração directa é a forma mais comum (Bailey *et al.*, 1992; Prusky & Lichter, 2007).

O *Colletotrichum*, como muitos outros fungos, diferencia uma célula infecciosa altamente especializada chamada apressório (Figura 2.6.) que se diferencia na ponta do tubo germinativo, após a germinação dos conídios. A formação de apressórios é induzida por sinais físicos ou químicos específicos fornecidos pelo hospedeiro (Deising *et al.*, 2000). Esta estrutura foi baptizada por B. Frank em 1883 na Alemanha com o significado de “órgão de adesão”. Assim, a primeira célula do hospedeiro é invadida pela formação da vesícula de infecção biotrófica de onde se desenvolvem hifas primárias que se ramificam, formando hifas secundárias necrotróficas finas e de rápido crescimento que colonizam os tecidos do hospedeiro e dão origem aos acêrvulos, onde novos conídios são produzidos (Prusky & Lichter, 2007; Horbach *et al.*, 2011).

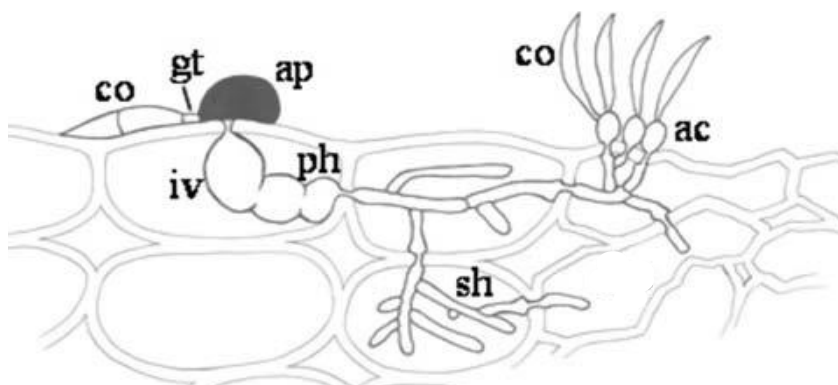


Figura 2.6. – Estruturas de infecção de *Colletotrichum graminicola*. Co – conídio (esporo assexuado); gt – tubo germinativo; ap – apressório; iv – vesícula de infecção; ph – hifas primárias; sh – hifas secundárias; ac – acérvulos. Adaptado de Horbach *et al.* (2011).

2.4.1.1.2 Bioquímica da patogénese

As espécies de *Colletotrichum* produzem um largo espectro de enzimas capazes de catalisar a degradação de componentes estruturais dos tecidos vegetais. Estas enzimas ocorrem frequentemente de acordo com dois tipos de actividade:

- a) As que degradam os polissacáridos, dissolvendo a parede celular e
- b) As que hidrolisam as cutículas.

As primeiras enzimas a serem produzidas pelo fungo pertencem à família das poligalacturonases, seguidas pelas liases de pectina que degradam os polímeros lineares de poligalacturonano e polímeros ramificados de pectina, respectivamente, contribuindo para a desestruturação das paredes celulares e permitindo o estabelecimento da infecção (Bailey *et al.*, 1992). Posteriormente, em fases mais avançadas da infecção, outras enzimas pertencentes às famílias de galactanases e arabanases degradam as ligações em polímeros ricos em galactano e arabano, respectivamente, contribuindo adicionalmente para a solubilização de constituintes da parede celular e conseqüente facilitação da invasão e a nutrição do patogénico (Bailey *et al.*, 1992). A actividade destas enzimas pode, assim, determinar a capacidade do patogénico causar doença. A actividade das poligalacturonases do fungo pode ser ainda modulada através de inibição da sua actividade por proteínas inibidoras produzidas pelo hospedeiro, tendo-se verificado que a actividade destas enzimas será maior nas cultivares resistentes à infecção (Bailey *et al.*, 1992). Adicionalmente a proteínas com actividade enzimática, várias espécies de *Colletotrichum* produzem fitotoxinas de baixo peso molecular que podem destruir as células vegetais, tais como aspargilo-marasminas, que foram já isoladas de *C. gloeosporioides* e quando aplicadas em folhas lesionadas do hospedeiro demonstraram provocar sintomas típicos da antracnose (Bailey *et al.*, 1992).

2.4.2. *Botrytis cinerea* Pers.

Esta espécie é considerada a 2ª mais importante de fungos fitopatogênicos, segundo a revista *Molecular Plant Pathology* (Dean *et al.*, 2012). Por causa da sua importância a nível mundial e da consequente disponibilidade de ferramentas de biologia molecular para estudar este microrganismo, tornou-se um dos agentes patagênicos fúngicos necrotróficos mais extensamente estudados no mundo (Williamson *et al.*, 2007). Esta espécie pode infectar quase todas as plantas e todas as partes das mesmas. O nome foi dado por Micheli em 1729 e deriva do grego, significando “cachos de bagas de uvas”, por causa do bolor cinzento que provoca em uvas. O nome *Botryotinia fuckeliana* é como a espécie é conhecida no seu estado sexual (Rosslensbroich & Stuebler, 2000). A doença que causa é vulgarmente conhecida como bolor cinzento (Santos *et al.*, 2008).

B. cinerea é mais destrutivo em frutos maduros e senescentes mas a infecção ocorre muito antes, passando por um período de quiscência. Afecta plantas localizadas em regiões tropicais e temperadas. Este fungo é difícil de controlar porque apresenta diversos modos de ataque, diversos hospedeiros como fonte de inóculo e pode sobreviver como micélio, conídios e, por períodos extensos, como esclerotos em restos de culturas no campo (Williamson *et al.*, 2007). Por exemplo, os esclerotos de *B. squamosa* que são formados nos resíduos de folhas da cebola e restos dos bolbos antes ou depois da colheita, sobrevivendo no solo por longos períodos de tempo, tornam-se a principal fonte de inóculo na primavera seguinte (Clarkson *et al.*, 2000). Os esclerotos são escuros e medem 1,70-1,85 mm X 0,90-1,69 mm, sendo visíveis à vista desarmada (Santos *et al.*, 2008) quando os esclerotos iniciam o seu crescimento produzem conidióforos e conídios multinucleados (Figura 2.7.) (Williamson *et al.*, 2007).

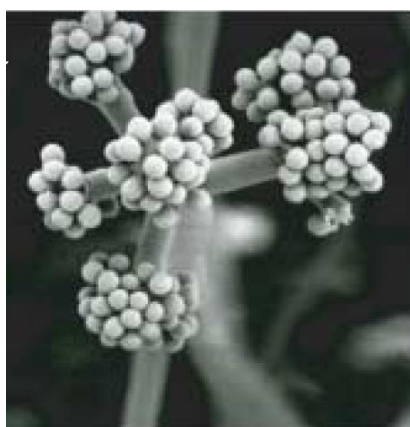


Figura 2.7. – Conidióforo com conídios maduros de *B. cinerea*. Adaptado de Williamson e colaboradores (2007).

B. cinerea produz 1 a 5 tubos germinativos a partir dos seus conídios e podem produzir apressórios que se distinguem daqueles do género *Colletotrichum* porque não têm uma parede celular a separar o apressório do tubo germinativo, impossibilitando a formação de elevada

pressão osmótica e, portanto, a penetração do hospedeiro não pode ficar a dever-se à mera força física (Williamson *et al.*, 2007).

2.3.3. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

O género *Alternaria* designa um grupo de fungos pertencente à família das *Dematiaceae* dos fungos imperfeitos com larga distribuição na natureza. Embora sejam patogénicos para as plantas, são parasitas facultativos fracos, endófitos e fundamentalmente saprófitos. É conhecida a sua capacidade de produzir toxinas específicas para o hospedeiro (Kusaba & Tsuge, 1995; Lou *et al.*, 2013), o que sugere uma co-evolução entre hospedeiro-parasita (Nishimura & Kohmoto, 1983).

As espécies do género *Alternaria* causam sintomas em toda a parte aérea das plantas. A doença expressa-se por meio de manchas foliares necróticas, circulares, elípticas ou angulares, pardo-escuras, isoladas ou em grupos, com a presença de anéis concêntricos e bordos bem definidos. Os conídios de *Alternaria* (Figura 2.8) apresentam dimensões em torno de 19,7-45,4 x 8,5-18,6 µm. Os conídios maduros apresentaram-se no formato de pera invertida, com coloração castanha clara, e 2-6 septos transversais e 1-5 septos longitudinais (Vasconcelos *et al.*, 2014).

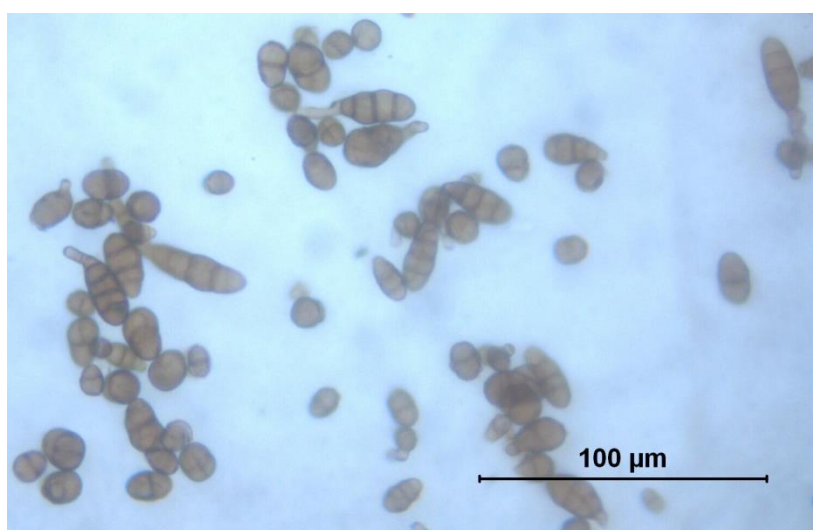


Figura 2.8 – Aspecto de esporos de *Alternaria alternata* em vários estágios de desenvolvimento, com formação de vários septos, observados em microscopia óptica.

Algumas micotoxinas encontradas no trigo, sorgo, girasol, tomate e algodão, produzidas por espécies de *Alternaria*, como o altenueno dibenzo-pirona (AE), alternariol (AOH), éter monometil de alternariol (AME) e ácido tenuazonico (TA) apresentam também toxicidade em mamíferos (Oviedo *et al.*, 2013).

2.4.4. *Stemphylium* sp.

As espécies pertencentes ao género *Stemphylium* provocam diversas doenças em plantas, destacando-se (Shishkoff & Lorbeer, 1989):

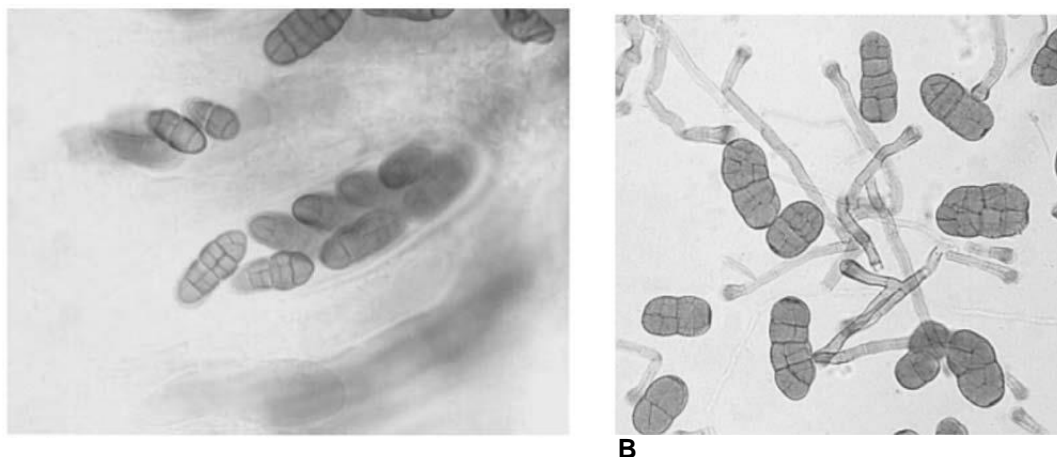
- a) Podridão negra na cenoura (*Daucus carota*) por *S. radicinum*;
- b) Mancha foliar na luzerna (*Medicago sativa*) por *S. botryosum*;
- c) Mancha foliar cinzenta no tomate (*Solanum lycopersicon*) por *S. solani*;
- d) Mancha castanha em peras (*Pyrus* sp.) por *S. vesicarium*;
- e) Queima foliar na cebola (*Allium cepa*) por *S. vesicarium*.

S. vesicarium é considerado um saprófita muito comum em plantas herbáceas, ou seja, o fungo é capaz de colonizar detritos vegetais que servem de inóculo para a próxima estação infectar outras plantas (Rossi *et al.*, 2005; Köhl *et al.*, 2009). As doenças provocadas por este género tornam-se mais graves em condições climáticas húmidas e quentes (Shishkoff & Lorbeer, 1989).

Os sintomas da doença provocada pelo fungo *S. vesicarium* na pereira consistem em lesões necróticas largas em folhas e rebentos e manchas necróticas que aumentam progressivamente de tamanho, levando ao apodrecimento do fruto (Rossi *et al.*, 2005). *S. vesicarium* produz dois tipos de toxinas, *SV-toxin I* e *SV-toxin II*, cuja concentração está relacionada com a severidade da necrose nos cultivares de pereira (Köhl *et al.*, 2009).

São produzidos dois tipos de esporos pelo agente patogénico (Cedeño *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2005):

- 1- Ascósporos – produzidos dentro de pseudotecas na fase teleomórfica, atribuindo-se o nome *Pleosporaallii*.
- 2- Conídios – produzidos na fase anamórfica e designando a espécie como *Stemphylium vesicarium*.



A

B

Figura 2.9.- Aspecto dos esporos nos estados teleomorfo e anamorfo: A – ascos com ascósporos de *Pleosporaallii*; B- conídios e conidióforos de *Stemphylium vesicarium*. Adaptado de Cedeño e colaboradores (2003).

Não foi detectada a presença das espécies *Stemhylium* spp. e *B. cinerea* em *J. curcas* na bibliografia consultada. No entanto, estes fungos foram usados para ensaios de resistência à antracnose em *J. curcas*. O emprego destes fungos fundamentou-se na disponibilidade/acessibilidade para uso, na capacidade de fitopatogenicidade e na possibilidade de aplicar os mesmos métodos de inoculação usados com o *C. gloeosporioides*.

2.5. Mecanismos de resistência e defesa de plantas a infecções fúngicas

A maioria das plantas apresenta algum grau de resistência aos agentes patogénicos, sendo que as camadas cuticulares cerosas e compostos antimicrobianos providenciam uma protecção passiva a patogénicos não especializados (Dangl & Jones, 2001). As plantas defendem-se contra agentes patogénicos através de barreiras físicas e químicas como a produção de péptidos, proteínas e metabolitos. Os mecanismos de defesa gerais são activados se as plantas recebem um sinal de *stress*. Quando uma infecção está em curso, um mecanismo geral de resistência é induzido denominado por "resistência sistémica adquirida" (SAR) e é acompanhado pelo aparecimento de proteínas, cuja presença e actividade estão correlacionados com a manutenção da resistência, as proteínas denominadas PR (*Pathogenesis Related*). O ácido salicílico (SA) é um sinal essencial para o desencadear dos mecanismos de implementação de SAR (Durand-Tardif & Pelletier, 2003).

A reacção hipersensitiva, caracterizada pela morte celular precoce do tecido no ponto de penetração do patogénico, é um dos mecanismos mais conhecidos de resistência às espécies de *Colletotrichum* por parte das diversas plantas hospedeiras (Esquerré-tugayé *et al.*, 1992).

Outro mecanismo geral de defesa induzido em muitas plantas é a activação do sistema anti-oxidativo.

2.5.1 Stress oxidativo

Os ataques por patogénicos, por perturbarem a homeostase celular, podem provocar um aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), tais como o anião superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singlete (1O_2) e radicais hidroxílicos ($\bullet OH$) que poderão ter efeitos positivos de sinalização e consequente defesa, ou negativos ao acumularem a níveis tóxicos, conduzindo à degradação de membranas e ácidos nucleicos. Uma das respostas celulares mais precoces ao reconhecimento do patogénico bacteriano ou fúngico é a formação de O_2^- ou do seu produto dismutado H_2O_2 no apoplasto, através de oxidases de NADPH da membrana plasmática e peroxidases da parede celular (Figura 2.10). Para lidar com a toxicidade causada por ROS, as plantas desenvolveram mecanismos anti-oxidativos eficientes, incluindo defesas não enzimáticas como a acumulação de moléculas como o ascorbato, a glutatona, o α -tocoferol e os carotonóides, e defesas enzimáticas como a

actividade de dismutases de superóxido (SOD), das enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa, da catalases (CAT) e de peroxidases (PX) que estão envolvidas na eliminação dos ROS nas células vegetais (Reilly *et al.*, 2003; Faize *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2012). A SOD converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio e a catalase converte o peróxido de hidrogénio em água (Figura 2.10) (Apel & Hirt, 2004).

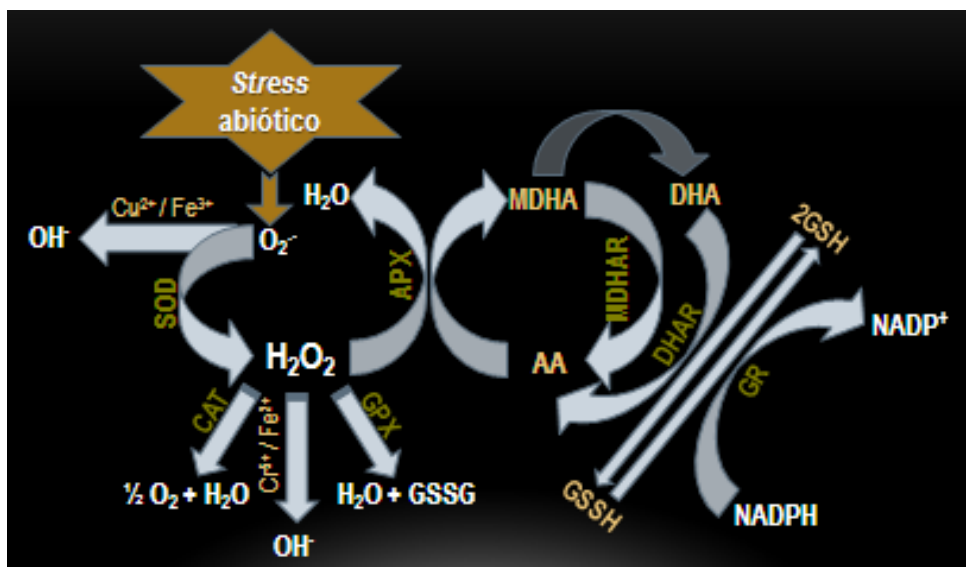


Figura 2.10. – Espécies reativas de oxigénio e o mecanismo de defesa antioxidante. As espécies reativas de oxigénio são eliminadas por enzimas antioxidantes: a dismutase de superóxido é responsável pela conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogénio; a peroxidase de ascorbato converte o peróxido de hidrogénio em ascorbato; a catalase transforma o peróxido de hidrogénio em água; a redutase de glutaciona controla os níveis de glutaciona reduzida, poderoso antioxidante não enzimático. AA – ascorbato; APX – peroxidases de ascorbato; CAT – catálase; DHA – dehidroascorbato; DHAR - Redutase de dehidroascorbato; GPX - Peroxidase de glutaciona; GR – redutase de glutaciona; GSH – glutaciona; GSSG - dissulfeto de glutaciona; MDHA - monodehidroascorbato; MDHAR – redutase de monodehidroascorbato; SOD - dismutase de superóxido.

Foi descrito um aumento da atividade enzimática das enzimas supra-referidas, incluindo da peroxidase de ascorbato (APX), em resposta a *stresses* ambientais (Caverzan *et al.*, 2012). As peroxidases catalisam oxidações de 1 electrão em que o dador de electrões pode ser uma série de substratos orgânicos ou inorgânicos e o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) serve como aceitador de electrões (Reilly *et al.*, 2003). No caso da APX, o dador de electrões é o ascorbato (Shikawa & Shigeoka, 2008). O sistema principal de desintoxicação de peróxido de hidrogénio nos cloroplastos das plantas é o ciclo de ascorbato-glutationa, em que APX é uma enzima chave (Figura 2.10). Esta enzima também atua no citosol, na mitocôndria e peroxissomas. As isoformas encontradas no citosol (cAPX), mitocôndria (mitAPX) e estroma do cloroplasto (sAPX) são solúveis, enquanto que as isoformas do peroxissoma (mAPX) e do tilacóide do cloroplasto (tAPX) estão ligadas à membrana (Caverzan *et al.*, 2012). Neste ciclo, o ascorbato é oxidado em monodehidroascorbato (MDHA) que, por sua vez, é reduzido pela redutase de

MDA (MDHAR), usando NAD(P)H. O dehidroascorbato (DHA) é produzido espontaneamente a partir de MDA e pode ser reduzida pela redutase de DHA (DHAR) com a ajuda da glutathione (GSH) que é oxidada a dissulfeto de glutathione (GSSG). O ciclo fecha com a redutase de glutathione (GR) que converte o GSSG de volta a GSH com o agente redutor NAD(P)H. O ciclo de peroxidase de glutathione (GPX) converte o peróxido de hidrogénio em água, usando equivalentes redutores do GSH (Apel & Hirt, 2004). Estes mecanismos de reforço da capacidade antioxidativa são respostas comuns da planta também a condições de stresses ambientais, tais como a seca, o frio, a salinidade ou a alta intensidade de radiação, e podem ser considerados mecanismos de protecção gerais contra stresses.

Como referido, apesar da sua actividade destrutiva, os ROS, em níveis não-tóxicos, estão descritos como mensageiros secundários em alguns processos celulares, incluindo a tolerância de stresses ambientais (Sharma *et al.*, 2012).

2.5.2. Proteínas relacionadas com a patogénese

As proteínas relacionadas com a patogénese (PR) desempenham um papel importante na resistência a doenças. Existem mais de 13 tipos diferentes de PR (Tabela 2.4), muitas com actividade antifúngica, das quais se destacam as PR1 que em concentrações micromolares demonstram ter actividade antifúngica, as PR2 que são da família das glucanases, as PR3 que pertencem à família das quitinases, as PR4 que são proteínas que se ligam à quitina mas sem actividade enzimática demonstrada mas que facilitam a hidrólise de quitinas insolúveis e as PR10 que são proteínas inibidoras de ribossomas (Borad & Sriram, 2008).

Agarwal e colaboradores (2012) purificaram, em *J. curcas*, uma proteína relacionada com a patogénese (*pathogenesis related*), JcPR-10a e verificaram que exibia actividades RNase e DNase, bem como antifúngica, nomeadamente contra *Macrophomina phaseolina*, fungo causador de podridão do colo. Mostraram que a expressão do transcrito *JcPR-10a* era regulada positivamente por cloreto de sódio, ácido salicílico, metiljasmonato e por inoculação com *M. phaseolina*. Os autores sugerem que a inibição do crescimento microbiano pode dever-se à actividade RNase que terá como resultado a degradação do RNA e, conseqüentemente, o impedimento da síntese proteica nos microrganismos.

Tabela 2.4 – Resumo da classificação de proteínas relacionadas com a patogênese e as suas propriedades. Adaptado de Loon *et al.* (1994); Loon *et al.* (2006); Sels *et al.* (2008).

Família	Membro tipo	Propriedades
PR-1	PR-1 ^a do tabaco	Antifúngica /desconhecida
PR-2	PR-2 do tabaco	β -1,3-glucanase
PR-3	P,Q do tabaco	Quitinase tipo I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	“R” do tabaco	Antifúngica / quitinase tipo I, II
PR-5	S do tabaco	Antifúngica / semelhante à taumatina
PR-6	Inibidor I do tomate	inibidora de Proteinase-
PR-7	P _{6g} do tomate	Endoproteinase
PR-8	Quitinase do pepino	Quitinase tipo III
PR-9	“Peroxidase formadora de linhina” do tabaco	Peroxidase
PR-10	“PR1” da salsa	Semelhante à ribonuclease
PR-11	Quitinase “classe V” do tabaco	Quitinase tipo I
PR-12	Rs-AFP3 do rabanete	Defensina
PR-13	THI2.1 de <i>Arabidopsis</i>	Tionina
PR-14	LTP4 da cevada	Proteína de transferência de lípidos
PR-15	OxOa (germina) da cevada	Oxidase de oxalato
PR-16	OxOLP da cevada	Semelhante à oxidase de oxalato
PR-17	PRp27 do tabaco	Desconhecida

2.5.3. Papel de enzimas degradativas da parede celular e formação de elicitadores

Diversas quitinases e β -1,3-glucanases produzidas pelas plantas podem inibir o crescimento de fungos por hidrólise dos glucanos presentes nas paredes celulares das pontas dos seus tubos germinativos e hifas. A combinação destes 2 tipos de enzimas apresenta uma actividade antifúngica mais forte para uma ampla gama de fungos do que a actuação separada de cada enzima (Han *et al.*, 2001; Devappa *et al.*, 2010), revelando um efeito de sinergia.

As quitinases são hidrolases conservadas que cortam as cadeias de quitina, polímero de N-acetilglucosamina (Punja & Zhang, 1993; Kasprzewska, 2003; Ober & Chupp, 2009) e que se caracterizam por um ponto isoeléctrico elevado. As plantas sintetizam 7 classes diferentes de quitinases que diferem na estrutura proteica, especificidade de substrato, mecanismo de catálise e sensibilidade a inibidores (Kasprzewska, 2003). As quitinases exibem dois mecanismos hidrolíticos diferentes: catálise assistida pelo substrato ou catálise ácida. Foi observado que estas enzimas têm diferentes actividades antifúngicas a diversos tipos de fungos *in vitro*. Muitas quitinases são expressas constitutivamente, aumentando a sua expressão significativamente quando a planta é sujeita a *stresses* tanto bióticos como abióticos (Punja & Zhang, 1993). As quitinases podem ser divididas em exo- ou endoquitinases, sendo que membros desta família enzimática podem exibir adicionalmente actividade de lisozima

(Collinge *et al.*, 1993; Punja & Zhang, 1993). As quitinases classe III pertencem à família de PR-8 e apresentam uma homologia elevada na sequência de aminoácidos para a enzima com dupla actividade de quitinase e de lisozima da euforbiácea *Hevea brasiliensis* (Ebrahim *et al.*, 2011).

As β -1,3-glucanases, por sua vez, possuem membros que são classificados como pertencendo à família das PR-2 e degradam o β -1,3-glucano, outro componente estrutural da parede celular dos fungos, sendo tal com a das quitinases a sua expressão coordenada, após a infecção fúngica (Ebrahim *et al.*, 2011).

Após a detecção do microrganismo, durante a interacção entre a planta e o agente patogénico são libertadas moléculas elicitadoras que se ligam aos receptores localizados na superfície da célula vegetal, induzindo respostas de defesa (Esquerré-tugayé *et al.*, 1992; Di Piero *et al.*, 2006; Thakur & Sohal, 2013). Os elicitadores são classificados como exógenos se a molécula é original do agente patogénico ou endógenos se forem compostos libertados pela planta como resultado da acção do agente patogénico (Thakur & Sohal, 2013). Os primeiros elicitadores a serem caracterizados foram fragmentos da parede dos fungos, como oligoquitisanos e oligoquitinas (Esquerré-tugayé *et al.*, 1992; Di Piero *et al.*, 2006).

Uma das primeiras enzimas secretadas por fungos, incluindo da espécie *Colletotrichum* é a endopoligalacturonase que degrada polissacáridos pécticos da parede vegetal (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1992; D'Ovidio *et al.*, 2004). Por parte de muitas plantas, as proteínas inibidoras da poligalacturonase (PGIPs) que estão presentes na parede das suas células limitam a colonização do fungo, ao abrandarem a actividade da endopoligalacturonase e favorecer a acumulação de oligogalacturonídeos, resultantes da degradação da pectina (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1992; D'Ovidio *et al.*, 2004). Os oligogalacturonídeos que, por um lado servem de fonte de carbono para o fungo e, por outro lado, funcionam como elicitadores endógenos que induzem respostas de defesa e protecção celular nas plantas (Esquerré-Tugayé *et al.*, 1992; Ridley *et al.*, 2001; D'Ovidio *et al.*, 2004). Mais especificamente, estes elicitadores podem levar à síntese de fitoalexinas, lenhina, etileno, *proteinase inhibitor 1*, β -1,3-glucanase, e espécies reactivas de oxigénio que são usadas também para sinalização. Estas evidências são suportadas por estudos recorrendo a transformação genética, tendo ficado demonstrado que a sobreexpressão dos genes *Atpgip1* e *Atpgip2* em *Arabidopsis* limita a colonização de *B. cinerea* e reduz os sintomas da doença (Di Matteo *et al.*, 2006). As PGIPs partilham com produtos de muitos outros genes de resistência uma estrutura de repetição rica em leucina (LRR) que permite o reconhecimento específico de moléculas derivadas do patogénico (De Lorenzo & Ferrari, 2002).

As glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) presentes em baixa concentração nas paredes celulares das plantas, aumentam após infecção de agentes patogénicos (Esquerré-tugayé *et al.*, 1992). As ligações cruzadas de HRGPs na parede celular vegetal funcionam como uma barreira física e fornecem resistência contra a actuação das enzimas dos fungos que degradam a parede vegetal (Deepak *et al.*, 2010). No melão (*Cucumis melo*), observa-se uma relação inversa entre a concentração de HRGP e a presença de *Colletotrichum*

lagenarium nas plantas infectadas (Esquerré-tugayé *et al.*, 1992). Constatou-se que há uma maior acumulação de HRGPs num genótipo resistente de sorgo do que num susceptível, 2 dias após a inoculação com *Colletotrichum sublineolum* (Basavaraju *et al.*, 2009).

2.5.4. Metabolitos secundários

Quando os tecidos da planta são danificados, as fitoanticipinas, metabolitos secundários constitutivos das plantas, são bioactivadas pela acção de β -glucosidasas (Morant *et al.*, 2008). Estes dois componentes quando combinados fornecem às plantas uma defesa química imediata contra herbívoros e patogénicos (Morant *et al.*, 2008).

Algumas plantas na sua resposta de defesa podem ainda produzir fitoalexinas que são metabolitos secundários com actividade antimicrobiana sintetizados em resposta à infecção por agentes patogénicos. Ficou demonstrado em feijão (*Phaseolus vulgaris*), que estas moléculas, apesar de inibirem o crescimento dos fungos, também são capazes de conduzir à morte das próprias células vegetais. Contudo, a morte precoce consequente da reacção hipersensível das células vegetais infectadas acontece antes da formação das fitoalexinas, mas que estes dois acontecimentos precedem a inibição do crescimento do fungo, fazendo com que esta relação temporal seja importante na definição dos processos de resistência ao fungo. No entanto, nem todas as plantas sintetizam fitoalexinas com a mesma relevância (Esquerré-tugayé *et al.*, 1992) e hospedeiros susceptíveis e resistentes mostram respostas semelhantes, diferindo na velocidade de formação das fitoalexinas (Brooks & Watson, 1985).

As espécies de *Jatropha* têm demonstrado ser uma fonte rica de péptidos cíclicos bioactivos com 7 a 10 resíduos de aminoácidos. Entre estes destacam-se a jatroidina, a curcina e as curcusonas. Jatroidinas são octapéptidos isolados do latex da purgueira e que mostraram ter um efeito antifúngico fraco contra espécies do género *Candida* e *Cryptococcus* (Devappa *et al.*, 2010; Sabandar *et al.*, 2013).

A curcina é uma toxina que inactiva ribossomas, inibindo assim a síntese proteica. A curcina-L apresenta actividades antifúngica e antiviral (Devappa *et al.*, 2010). Pelo menos um membro desta família, expressa-se nas folhas sob condições de *stress* abióticos e bióticos (Devappa *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2005). Outros compostos como as curcusonas C e D também demonstram actividades antifúngicas, enquanto que a curcusona B é citotóxica e é ainda relatada mais de uma dezena de compostos com actividade antibacteriana (Sabandar *et al.*, 2013).

Outros constituintes químicos abundantes relatados em *J. curcas* são diterpenos e triterpenos com bioactividades de largo espectro, como antibacteriana, antiplasmódica e, especialmente, citotóxica (Liu *et al.*, 2012).

Muitos fenóis e flavonóides desempenham um papel protector nas plantas contra os seus patogénicos e têm a capacidade generalizada de inibir a germinação de esporos de fungos. A maioria dos flavonóides reconhecidos como agentes antifúngicos constitutivos são isoflavonóides, flavanos e flavanonas (Harborne & Williams, 2000). Na *J. curcas*, o conteúdo

em fenóis é maior nas folhas, 38,80 µg/mL equivalentes de ácido gálico e o latex da planta apresenta o maior conteúdo de flavonóides com 18,14 µg/mL equivalentes de quercitina (Sharma *et al.*, 2012).

2.6 O genoma de *Jatropha curcas*

O genoma completo de *Jatropha curcas* foi sequenciado pelo instituto japonês *Kazusa DNA Research Institut* em 2010. A informação resultante da análise do genoma permitirá facilitar e acelerar, em última análise, o melhoramento genético (Sato *et al.*, 2010; Hirakawa *et al.*, 2012). Esta espécie diploide ($2n = 22$) possui cromossomas pequenos com um comprimento descrito como variando entre 1,00 a 3,67 µm (Sujatha *et al.*, 2008; Divakara *et al.*, 2010;) ou entre 1,71 a 1,24 µm (Carvalho e colaboradores 2008), antes da sequenciação do genoma. O tamanho do genoma da *J. curcas* foi descrito como sendo relativamente pequeno ($C = 416$ Mb) (Carvalho *et al.*, 2008) e é sugerido que derive de antepassados poliplóides. Os mesmos autores acrescentam ainda que o nível de GC (38,7%) no genoma de *J. curcas* é o mesmo encontrado em *Arabidopsis* e que é típico das dicotiledóneas. Apesar de estar sequenciado, a informação sobre o genoma encontrada até ao momento é ainda escassa devido a insuficiente anotação. Germoplasma de *J. curcas* está a ser recolhido em todo o mundo com o objectivo de melhoramento de culturas, como para todas as espécies cultivadas.

O melhoramento genético e a domesticação de *J. curcas* deverão seguir o mesmo curso que o rícino, planta da mesma família (Divakara *et al.*, 2010). O rícino passou de perene a anual com alterações nos internódios e na proporção do género das flores (Divakara *et al.*, 2010). O sucesso destas alterações foi conseguido a partir de técnicas de mutação e selecção de germoplasma. *J. curcas* pode ser melhorada através da avaliação da variação de acessos selvagens e escolha de melhores genótipos, aplicação de mutações e transferência de genes exógenos para alcançar os traços desejáveis. Estes são um elevado rendimento da semente e do conteúdo de óleo, melhoramento de propriedades do óleo/combustível, maturação mais precoce, redução da altura da planta, maior proporção de flores femininas do que masculinas, tolerância à seca e resistência a doenças e pragas (Divakara *et al.*, 2010; Sujatha *et al.*, 2008). O facto de *J. curcas* se ter adaptado a um grande leque de locais e condições ecológicas e a existência de 175 espécies no género *Jatropha* sugere que haja variabilidade genética considerável para ser explorada (Divakara *et al.*, 2010).

O renovado interesse em *J. curcas* para a produção de biodiesel tem levado a maior pesquisa com o intuito de um aumento dos rendimentos. O cultivo em larga escala desta planta, encara problemas relacionados com pestes e doenças, nomeadamente a antracnose. Daí, o interesse em seleccionar variedades mais resistentes.

Recorrer-se-á a técnicas de microscopia electrónica e óptica com o intuito de observar e acompanhar a infecção provocada pelo *Colletotrichum gleosporoides* em folhas de 2 acessos de *Jatropha curcas*, um resistente e outro susceptível a este fungo.

De forma a averiguar se a tolerância à antracnose provocada pelo *Colletotrichum gloeosporoides* se deve a diferenças de regulação ao nível do transcriptoma, pesquisar-se-á a expressão e quantificação de um conjunto de genes candidatos de defesa das plantas.

De forma a entender se a resistência observada contra antracnose é específica para o *Colletotrichum gloeosporoides*, far-se-á ensaios de medição da infecção provocada por outros 3 fungos, nomeadamente *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* e *Stemphylium* sp.

3. Material e métodos

3.1. Rastreios de Resistência a Fungos em Folhas de *Jatropha curcas*

3.1.1. Material vegetal

O material vegetal seleccionado para este estudo consistiu em folhas destacadas de 16 genótipos de *Jatropha curcas* provenientes de várias origens geográficas (Tabela 3.1) e pertencentes a uma colecção de germoplasma de *J. curcas* estabelecida e mantida no Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT). As plantas foram cultivadas por sementeira directa em vasos plásticos de 35 L contendo uma mistura de solo e areia (2:1) e mantidas em estufa (15 x 16 m) sob condições de luz e temperatura naturais. Folhas jovens completamente expandidas de plantas com 4 anos de idade foram utilizados para os ensaios. Os genótipos usados foram seleccionados de acordo com uma escala de resistência a *C. gloeosporioides* estabelecida por Ferreira-Pinto e colaboradores (2011) (Tabela 3.1).

3.1.2. Preparação dos meios de cultura

Foram colocados 39 g de agar de batata dextrosada ou PDA (Merck®) em 1 L de água destilada num frasco e aqueceu-se no micro-ondas até dissolver completamente. A seguir distribuiu-se 15 mL de meio para diversos tubos com um dispensador. Os tubos foram autoclavados durante 20 min a 121° C e depois de arrefecidos, foram conservados a 4° C. Para utilização do meio, os tubos foram colocados em banho-maria até derreter o meio, transferidos para uma câmara de fluxo laminar (Envair® W7518), onde, passando-se a abertura pela chama, foi vertido o meio em caixas de Petri (90 cm de diâmetro) e aguardou-se cerca de 30 min para solidificação.

3.1.3. Preparação dos isolados de fungos e dos inóculos

A escolha dos fungos foi baseada em diferentes tipos de patogenicidade mas sobretudo na acessibilidade dos mesmos. As espécies usadas para a preparação de inóculo foram *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, ambas isoladas de purgueira e *Stemphylium* sp., isolada de macieira. Culturas frescas de cada fungo foram subcultivadas para caixas de Petri (90 cm de diâmetro) com meio de PDA e incubadas em estufa a 22° C durante 7 dias. Na câmara de fluxo laminar, com recurso a um furador, fizeram-se diversos discos de micélio nas margens da cultura da caixa de Petri.

3.1.4. Condições de inoculação

Foram recolhidas 4 folhas de cada um dos 16 acessos em análise, esterilizadas à superfície por imersão em hipoclorito de sódio a 1 % durante 2 min, seguido por lavagem em água

destilada estéril durante 1 min e secagem à temperatura ambiente. Em seguida, as folhas foram colocadas sobre uma rede de plástico dentro de tabuleiros de plástico (37 x 27 cm x 5 cm) com tecido de feltro humedecido, por baixo da rede. Três feridas artificiais foram feitas com uma agulha hipodérmica esterilizada sobre o lado adaxial das folhas. Para cada fungo, um disco de micélio de 4 mm foi em seguida colocado com a ajuda de uma ansa estéril na superfície de cada ferida. Foram utilizadas três folhas independentes por acesso (num total de 9 pontos de inoculação) e as folhas de controlo foram tratadas com discos de PDA estéreis. Os tabuleiros foram cobertos com sacos de polietileno transparente para manter o nível de humidade durante as primeiras 48 h, colocados durante 7 dias numa sala de ambiente controlado à temperatura de 25° C, humidade relativa elevada (85%) e um regime de fotoperíodo de 12 h de luz.

3.1.5. Avaliação da progressão dos sintomas

As folhas foram observadas três e sete dias após cada inoculação, tendo sido, a cada período, registado o número e diâmetro das infecções no material vegetal inoculado. Aos resultados obtidos 7 dias após a inoculação aplicou-se a escala adaptada de López & Lucas (2010) que define 5 tipos diferentes de graus de sintomas: 0 - sem sintomas macroscópicos; 1 - lesões pequenas até 0,2 cm; 2 - lesões entre 0,2 e 0,4 cm; 3 - lesões entre 0,4 e 0,7 mm; 4 - lesões entre 0,7 e 1,0 cm; 5 - lesões maiores que 1,0 cm ou coalescentes. De seguida aplicou-se a fórmula de quantificação do grau de “Severidade da Doença”, adaptada de Tivoli e colaboradores (2006).

Severidade da doença (%)

$$= \frac{\sum(\text{número de lesões} \times \text{valor da escala correspondente ao diâmetro medido}) \times 100}{\text{número máximo de lesões possíveis} \times \text{valor máximo da escala correspondente ao diâmetro das infecções}}$$

Consoante o resultado de Severidade obtido para cada fungo, definiram-se três classes de resistência:

- R – resistente → valor da Severidade < 20,00%;
- MR - moderadamente resistente → 20,00% ≤ valor da Severidade < 26,67%;
- S – susceptível → valor da Severidade ≥ 26,67%.

Com o intuito de obter um crivo apertado no rastreio à resistência, considerou-se *susceptível*, um acesso que apresentava valores de severidade iguais ou superiores a 26,7%, percentagem que representa pelo menos 33,3% de incidência de infecção (isto é, 3 em 9 pontos de inoculação) com diâmetro superior ou igual a 0,8 cm. Considerou-se *moderadamente resistente*, valores de severidade iguais ou superiores a 20,0%, percentagem que representa pelo menos 33,3% de incidência de infecção com diâmetro superior ou igual a 0,4 cm. Por conseguinte, considerou-se *resistente*, valores de severidade inferiores a 20,0%. Os limites para os diâmetros foram baseados e adaptados de López & Lucas (2010) e de Ferreira-Pinto e colaboradores (2011).

Os dados das medições das lesões provocadas em resposta à infecção por todos os fungos testados foram tratados por uma análise de componentes principais. A representação gráfica das dissimilaridades entre acessos foi efectuada com base na matriz de correções par-a-par, com recurso ao programa NTSYS-pc versão 2.20 (Rohlf 2005). O algoritmo EIGEN foi utilizado para decomposição de vectores próprios e gerar o gráfico de componentes principais, permitindo distinguir categorias entre acessos. A árvore de conexões mínimas foi calculada através da aplicação MST para identificar a distância mais próxima entre dois acessos na representação bidimensional

ID do Acesso	Origem	Resistência à antracnose
J2	Cabo Verde	R
J45	Cabo Verde (Picos, Ilha de Santiago)	MR
J46	Cabo Verde (S. Domingos, Ilha de Santiago)	S
J47	Cabo Verde (S. Jorge, Ilha de Santiago)	S
J49	Cabo Verde (Tarfal, ilha de Santiago)	R
J51	China	S
J53	Ghana	MR
J54	Moçambique	R
J55	Brasil (Minas Gerais)	R
J58	Brasil (Jequitinha)	MR
J61	Suriname	S
J64	Guiné Equatorial	MR
J67	Madagáscar	S
J71	México (Castillo de Teayo)	R
J73	México (Yantepec)	R
J78	Cabo Verde (Campanas, ilha do Fogo)	S

Tabela 3.1- Lista e origem dos acessos de *Jatropha curcas* usados nos ensaios e respectiva classificação de nível de resistência à antracnose, avaliada de acordo com Ferreira-Pinto e colaboradores (2011). A negrito, os acessos usados nas observações por microscopia e na quantificação da expressão génica.

3.2. Acompanhamento da progressão da infecção da antracnose por microscopia em folhas de *Jatropha curcas*

3.2.1. Preparação e inoculação do material vegetal

Folhas destacadas de *Jatropha curcas* de 2 genótipos previamente classificados como apresentando diferentes níveis de resistência à antracnose, J51 (S) e J49 (R) (Tabela 3.1), foram desinfectadas como descrito em 3.1.4. Cada folha foi inoculada com *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em 4 lesões equidistantes. As

lesões foram efectuadas com uma agulha esterilizada e sobre estas fez-se a inoculação com uma gota de 10 µL de uma suspensão de esporos (5×10^7 esporos/mL) obtida através da raspagem de micélio de uma caixa de Petri, com 7 dias de crescimento seguido de filtração com gaze esterilizada. A concentração foi determinada, utilizando um hemacitómetro. As folhas foram incubadas em tabuleiros com rede e tecido de feltro humedecido, em sala climatizada a 25° C, humidade relativa elevada 85% com um fotoperíodo de 12 h e recolhidas ao fim de 24, 48, 72, 96 e 120 h após a inoculação.

3.2.2. Observação por microscopia óptica

O tratamento das amostras foi baseado no protocolo de Alberto e colaboradores (2002). As folhas foram recortadas à volta da lesão ($\approx 0,3 \times 0,3$ cm) e clarificadas por incubação numa solução de etanol: clorofórmio: ácido tricloroacético (96:3:1 v/v) durante uma semana à temperatura de 4° C.

As amostras clarificadas foram coradas em uma mistura de 2/3 de 15% de ácido tricloroacético em água e 1/3 de 0,6% de corante BrilliantBlue G (Acros Organics, New Jersey – USA) em metanol. As amostras recolhidas ao fim de 24 h ficaram imersas durante 15 min, as de 48 a 72 h durante 30 min e as amostras de 96 e 120 h durante 45 min (Alberto *et al.*, 2002). As amostras de folhas coradas foram seguidamente lavadas 2 vezes em água destilada e secas sobre papel de filtro.

De seguida, as amostras coradas foram dispostas em lâminas cujo meio de montagem era uma solução de ácido acético glacial: glicerol: água (5:20:75 v/v). As amostras foram então sobrepostas com uma lamela, seladas com verniz e observadas num microscópio óptico Leica DMLA e as imagens adquiridas e tratadas com o *software* Qwin/Plus.

3.2.3. Observação por microscopia electrónica de varrimento

O protocolo seguido foi baseado em Babu e colaboradores (2011) com alterações. Sucintamente, após serem recortadas à volta da lesão ($\approx 0,3 \times 0,3$ cm), as folhas foram fixadas durante 2 h em uma solução de 2,5% glutaraldeído preparado em 0,05 M tampão fosfato (pH = 6,8). Seguidamente, as amostras foram incubadas numa solução de etanol a 50% a 4° C durante pelo menos 1 semana até ficarem clarificadas até ao máximo para cada condição. As amostras foram, então, desidratadas em séries graduais de etanol e acetona: começando numa concentração de 50%, passando para 70%, 90% e 2 vezes em 100% de etanol, e prosseguindo com soluções a 3:1, 1:1 e 1:3 de combinação de etanol e acetona, durante 15 min cada etapa.

Posteriormente, as amostras foram secas pelo ponto crítico (Quorum E3100) e coladas à superfície de pioneses de cobre cobertos com uma camada de verniz. As amostras foram montadas i) na horizontal com amostras viradas para cima e para baixo; e ii) na vertical, com a zona da lesão cortada ao meio. Finalmente, as amostras foram metalizadas (JEOL JFC-1200 Fine Coater) e observadas num microscópio electrónico de varrimento (JEOL JSM-5200LN) na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL).

3.3. Quantificação da expressão de genes de *J. curcas* em resposta à infecção por *C. gloeosporioides*

3.3.1. Tratamento, recolha e preparação das amostras

As amostras de folhas de *Jatropha curcas* dos acessos J51 e J49 foram sujeitas a um tratamento semelhante àquele descrito em 3.1.1 a 3.1.5. Resumidamente, as folhas foram feridas por uma agulha esterilizada em 4 pontos equidistantes e inoculadas com discos com micélio de *C. gloeosporioides*. As folhas foram recolhidas ao fim de 8, 24, 48, 72 h. Para o controlo do ferimento, foi feito o mesmo procedimento, mas usando discos de meio de PDA estéreis, substituindo os discos com micélio.

Adicionalmente, uma amostra sem ferida e sem inóculo foi recolhida no tempo 0 h, para ser usada como controlo adicional.

Após a recolha, as folhas foram recortadas à volta da lesão ($\approx 0,5$ cm), e cerca de 30 recortes foram juntos e macerados em azoto líquido com o auxílio de um almofariz e pilão, gelados e previamente tratados com RNase AWAY®. Para cada amostra, foram transferidos 250 mg de macerado (Mettler® AE240) para um *ependorf* de 2 mL previamente tarado e arrefecido com azoto líquido. As amostras ficaram guardadas em azoto líquido, enquanto se aguardava processamento ou foram armazenadas a -80° C.

3.3.2. Extração do RNA

O RNA total foi extraído em cada amostra usando o protocolo baseado em Chang e colaboradores (1993) com modificações. A cada *ependorf* com 250 mg de macerado foi acrescentado 1,5 mL de Tampão de Extração (2% de CTAB, 100 mM tris-HCl, 25 mM EDTA e 2 M NaCl) pré-aquecido a 65° C e ao qual se adicionou 2% de mercaptoetanol fresco, e misturou-se bem, vortexeando (Biosan Sai V-1 Plus). Seguidamente, a mistura foi incubada durante 15 min em banho-maria a 65° C, misturando-se por inversão aos 7 min.

De seguida, fez-se uma extração com 1,5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturando por inversão durante 5 min e centrifugando (Labogene®) a $10\ 000 \times g$ a 20° C durante 10 min. Ao sobrenadante transferido para outro *ependorf* acrescentou-se $\frac{1}{4}$ do seu volume de 10 M cloreto de lítio e incubou-se em gelo (0° C) *overnight*.

A mistura foi centrifugada a $10\ 000 \times g$ a 4° C durante 20 min e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi, seguidamente, ressuscitado em 0,75 mL de Tampão SSTE (1 M NaCl, 0,5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) pré-aquecido a 37° C. A solução foi incubada em banho-maria a 37° C durante 7 min. De seguida, realizou-se nova extração com 0,75 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturando por inversão durante 5 min e centrifugando a $10\ 000 \times g$ a 20° C durante 10 min. Recolheu-se o sobrenadante e juntou-se igual volume

(aproximadamente 0,7 mL) de isopropanol gelado (-20° C), misturando-se por inversão e incubou-se a -20° C durante 4 h.

Posteriormente, centrifugou-se as amostras a 13 000 x g a 4° C durante 20 min e descartou-se o sobrenadante. Seguidamente, lavou-se o *pellet* com 250 µL de etanol 70% a -20° C, centrifugando-se a 13 000 x g a 4° C durante 20 min. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem com etanol. O *pellet* foi seco ao ar durante 15 min e ressuspendeu-se em 30 µL de água estéril (Qiagen®). Após 30 min, verificou-se o resultado da extracção, incluindo a integridade e pureza das amostras em gel de agarose 1,5% (Invitrogen®) (ver 3.3.3.1) e as amostras de RNA foram armazenadas a -80° C.

3.3.3. Electroforese em gel de Agarose

3.3.3.1. Preparação do gel

Foram pesados 0,75 g de agarose (Invitrogen®) e transferidos para um frasco *Schott* contendo 50 mL de 1xTAE para se obter um gel com a concentração de 1,5% de agarose. A agarose foi dissolvida num micro-ondas e deixou-se arrefecer até cerca de 50° C antes de se acrescentar 3 µL de corante Greensafe Premium (Nzytech®), misturou-se e foi, então, vertida para uma tina de electroforese, colocaram-se os pentes e de seguida, deixou-se polimerizar durante cerca de 30 min.

3.3.3.2. Electroforese

No primeiro poço foi colocado 0,3 µg de marcador molecular (Bioron®) de 100 pb. Em parafilme foram colocados 2 µL de corante Runsafe (Cleaver®) e 4 µL de cada amostra de RNA, misturou-se com a micropipeta e transferiu-se para os poços do gel colocado na tina de electroforese (Cleaver® ScientificLtd) e coberto com tampão TAE. A electroforese decorreu a 80 V e 300 mA durante 30 min e, por fim, os produtos foram visualizados em luz ultravioleta.

3.3.4. Purificação do RNA

Num *ependorf* de 1,5 mL, foram adicionados 26 µL de amostra de RNA, 3 µL 10x tampão de Dnase I com MgCl₂ (100 mM tris-HCl pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂) (DNA-Free™, Ambion®) e 2 unidades de DNase (DNA-Free™, Ambion®) e foi feito um rápido *spin* numa centrífuga (Labogene®, tipo: Scanspeed mini). A mistura foi incubada a 37° C durante uma hora em banho-maria pré-aquecido para se efectuar a completa digestão do DNA contaminante. Para inactivar a DNase I foram usados 3 µL de tampão de inactivação (DNA-Free™, Ambion®) e deixou-se actuar durante 8 min. Finalmente, centrifugou-se a amostra a 13 000 x g durante 5 min e transfere-se o sobrenadante, contendo o RNA purificado, para um novo *ependorf*.

A seguir verificou-se em gel de agarose 1,5% a concentração e a integridade do RNA.

A presença/ausência de DNA contaminante é verificada através da amplificação por PCR e corrida em gel de agarose do produto amplificado.

3.3.5. PCR

A presença de DNA contaminante foi verificada através de PCR convencional. Foi preparada a mistura reaccional com 13,8 µL de água destilada, 2 µL de tampão 10x concentrado (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl) 0,4 µL de mistura de 4 dNTPs a 2 mM, 1 µL de *primer forward* de actina (Tabela 4.5) a 10 µM e 1 µL de *primer reverse* de actina (Tabela 4.5) a 10 µM e 4 unidades de Taq DNA polimerase. A mistura é transferida para um microtubo e adiciona-se 1 µL de amostra de RNA purificado. As amostras são transferidas para o termociclador (Analytikjena®) e seguiu-se o programa de amplificação: 4 min a 94° C, 35 x (30 s a 94° C, 1 min a 60° C, 1 min a 72° C), 7 min a 72° C.

Para verificar a purificação do RNA extraído, são usados 2 controlos: o controlo positivo, em que o RNA é substituído por amostra de DNA e o controlo negativo, sem a presença de ácidos nucleicos, substituindo o RNA por água destilada purificada. Os produtos da amplificação são corridos em gel de agarose como descrito em 3.3.3.1.

3.3.6. Quantificação do RNA/DNA

Para a quantificação dos ácidos nucleicos, foram adicionados 2 µL de amostra num poço de uma placa multivolume (Tak3™, Biotek®) e lêu-se no espectrofotómetro (Tak3™, Biotek®) às absorvâncias de 230, 260 e 280 nm. A pureza e concentração dos ácidos nucleicos foram calculadas com base nos seguintes pressupostos e a partir das seguintes fórmulas:

Para DNA puro, $A_{260}/A_{280} \approx 1,8$;

Para RNA puro, $A_{260}/A_{280} \approx 2,0$;

Ausência de contaminantes de glúcidos e fenóis, $A_{260}/A_{230} \approx 2,0-2,2$;

$[DNA] = A_{260} \times 80 \times 50$ (µg/ml) ;

$[RNA] = A_{260} \times 80 \times 40$ (µg/ml).

3.3.7. Síntese de cDNA

Em microtubos foi preparada uma mistura de 28 ng de RNA, 0,5 µg de oligo (dT)₁₂₋₁₈ e 1 µL de 10 mM dNTPMix (Bioron®). De seguida, os microtubos foram transferidos para o termociclador (Analytikjena®), onde o RNA foi desnaturado a 65° C durante 5 min, seguindo-se uma incubação em gelo durante 2 min.

Entretanto, foi preparada a mistura reaccional com 4 µL 5x *First Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3 a temperatura ambiente; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) (invitrogen™), 2 µL 0,1 M DTT (invitrogen™), 40 unidades de Inibidor da Ribonuclease Recombinante (RNaseOUT™) e

200 unidades de Transcriptase Reversa (M-MLV RT, invitrogen™) para cada amostra. Obtém-se, assim, 8 µL de mistura que foi adicionada aos microtubos anteriores que voltaram a ser colocados no termociclador para incubar a 37° C durante 1 h 10 min e, finalmente, a transcriptase reversa foi inativada, a 70° C durante 15 min.

O cDNA obtido é quantificado como descrito em 3.3.6. e cada amostra foi diluída para a concentração de 150 ng/µL, usando água destilada estéril (Sigma®).

3.3.8. Escolha de genes, desenho e cálculo da eficiência de amplificação dos primers

As sequências dos genes de interesse e de referência foram obtidas nas bases de dados da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no repositório do Genoma da *Jatropha* (<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>). As sequências obtidas foram comparadas através do seu alinhamento com recurso ao algoritmo ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para confirmar a anotação e remover eventuais duplicados. A partir das sequências seleccionadas, os *primers* foram desenhados com recurso ao aplicativo Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>). As sequências obtidas foram ainda analisadas no *OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>) para identificar a probabilidade formação de *hairpins* e estruturas secundárias.

A escolha dos genes de referência (Tabela 3.2) foi baseada no estudo realizado por Zhang e colaboradores (2013). Nele, os autores procuraram seleccionar genes de referência para estudos de expressão génica usando PCR em tempo real para *J.curcas*, em diferentes tipos de condições. O conjunto “actina + GAPDH + TUB5” refere-se a condições de *stress* ambiental, sendo o que mais se adequa às condições usadas.

Os genes de interesse (Tabela 3.3) foram 3 curcinas, 3 proteínas relacionadas com a patogénese, 6 quitinases do tipo III e as peroxidases de ascorbato citosólica e tilocoidal.

Tabela 3.2 - Lista de genes de referência usados.

Nome da Proteína	Genebank ID	Cds Completo (c) /parcial (p)	Função	Referência
Actina	Jcr4S06558.10	P	Usado como gene de referência	Zhang <i>et al.</i> , 2013
TUB5 (<i>tubulin beta chain</i>)	GW878948.1	P	Usado como gene de referência	
GAPDH (<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)	Jcr4U29393.10	p	Usado como gene de referência	

Antes de se proceder à quantificação da expressão génica, a eficiência de cada par de *primers* foi calculada através de um qRT-PCR, partindo de séries de diluições conhecidas de um *mix* de

cDNA. De um modo sucinto, partindo de uma mistura de cDNA de diferentes amostras a uma concentração de 150 ng/μL, foi feita uma diluição seriada 1:5, obtendo-se cDNA nas concentrações de 150, 30, 6, 1,2 ng/μL. Estas amostras foram então amplificadas em triplicados através de um qRT-PCR nas condições descritas em 3.3.8. Como controlo da especificidade de amplificação foi analisada nesta fase a curva de *melting* gerada para cada par de primers.

Tabela 3.3 - Lista de genes de interesse pesquisados.

Nome da Proteína	Genebank ID	Cds Completo (C) /parcial (P)	Função	Associação a resposta a fungos	Referência
Curcina "a"	FJ357424.1	C	Proteína inibidora de ribossoma	-	-
Curcina "b"	Jcr4U30724.10	P		-	-
Curcina "c"	Jcr4S02263.20	P		-	-
JcPR-b (<i>pathogenesis-related protein</i>)	Jcr4S00918.30	P	Proteína relacionada com a patogenicidade	-	-
JcPR-10a (<i>pathogenesis-related protein</i>)	JN566052.1	C	Actividade RNase e DNase	<i>Macrophomina</i>	Parinita <i>et al.</i> , 2012
JcPR-c (<i>pathogenesis-related protein</i>)	Jcr4S03620.40	P	Proteína relacionada com a patogenicidade	-	-
Quitinase tipo III "a"	Jcr4S00001.180	P	Degradação da quitina na parede dos fungos	-	-
Quitinase tipo III "b"	Jcr4S00001.190	P		-	-
Quitinase tipo III "c"	Jcr4U35651.10	P		-	-
Quitinase tipo III "d"	Jcr4S00022.50	P		-	-
Quitinase tipo III "e"	Jcr4S00022.40	P		-	-
Quitinase tipo III "f"	Jcr4S00022.110	P		-	-
Peroxidase de ascorbato citosólica - cAPX	FJ619044.1	C	Eliminação de ROS, resposta a stresses ambientais	-	-
Peroxidase de ascorbato tilacoidal - tAPX	KF560416.1	C		-	-

Os dados foram tratados em uma folha de cálculo (Microsoft Excel), sendo desenhado um gráfico em que o logaritmo de base 10 da quantidade inicial de DNA (ng) fica no eixo dos xx e o valor da média das 3 réplicas do C_t (*cycle threshold*) fica no eixo dos yy. De seguida, ajusta-se os pontos a uma recta e o valor do declive é usado no cálculo da eficiência $Ef = (10^{-(1/\text{declive})} - 1) \times 100\%$.

3.3.9. Expressão génica por PCR em tempo real (qRT-PCR)

A mistura reaccional foi feita em um *eppendorf* de 1,5 mL envolto em papel de alumínio para proteger da luz, onde são adicionados 3,9 μL de água purificada, 1,5 μL de *primer forward* a 3 μM , 1,5 μL de *primer reverse* a 3 μM e 7,5 μL de qPCRmix (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix) por cada amostra, misturando bem com a pipeta. De seguida, transferiu-se 14,4 μL desta mistura para cada um dos poços de uma placa (Bioplastics) e acrescenta-se 90 ng em 0.6 μL de cada amostra de cDNA. A placa foi tapada com um selante adesivo transparente (Microseal®).

As amplificações decorreram num termociclador Analytikjena® e usou-se o programa de amplificação de 95° C durante 30 s, 40x (95° C durante 5 s e 60° C durante 30 s).

Para cada gene, numa folha de cálculo, foram analisadas as médias e os desvios-padrão dos C_t (*cycle threshold* – ciclo limiar) obtidos para cada amostra. De seguida, foi quantificada a expressão relativa de cada gene, normalizada para os genes de referência, usando as fórmulas descritas por Vandesompele e colaboradores (2002).

$$\text{Expressão normalizada} = \frac{Ef^{\Delta Ct} \text{ Gene de interesse}}{\text{Média geométrica } [Ef^{\Delta Ct} \text{ Genes de referência}]}$$

$$\Delta Ct = \text{menor } Ct - Ct \text{ de cada amostra}; \quad Ef = (10^{(-\frac{1}{\text{declive}})} - 1)$$

$$\text{Erro padrão} = \frac{\sqrt{GInorm \times \left[\left(\frac{SDnf}{nf} \right)^2 + \left(\frac{SDGI}{GI} \right)^2 \right]}}{\sqrt{m}}$$

GInorm – expressão relativa normalizada do gene de interesse;

NF – factor de normalização;

SDnf – desvio padrão do factor de normalização;

GI – quantidade calculada para o gene de interesse (= $Ef^{\Delta Ct}$);

SDGI – desvio padrão da quantidade do gene de interesse;

m – número de réplicas.

De seguida, e para que os valores fossem expressos em função da variação de expressão, os valores da expressão relativa normalizados são transformados através de \log_2 relativamente às amostras controlo, em duas abordagens: i) tempo zero e ii) ferida sem inóculo.

4. Resultados

4.1. Acompanhamento da progressão da infecção através de microscopia

O progresso da antracnose em folhas de *J.curcas* foi avaliado num acesso resistente (J49) e um acesso susceptível (J51) através de acompanhamento morfológico das estruturas por microscopia óptica e electrónica de varrimento, ao longo de 5 dias após inoculações controladas com *C. gloeosporioides*.

Nos pontos de inoculação, as folhas haviam sido feridas e podem ser observadas nas Figuras 4.1. e 4.2. Convém distinguir os termos *ferida* e *lesão* que, neste trabalho, são usados com significados diferentes. Entende-se como ferida o resultado dos danos mecânicos provocados propositalmente sobre a folha com o auxílio de uma agulha, para efeitos de inoculação. Entende-se como lesão o dano da folha resultante da infecção e do desenvolvimento do fungo. Para serem usadas em microscopia óptica, as amostras haviam sido coradas por Azul Brilhante G, o que permite distinguir as estruturas do fungo no material vegetal. Ao fim de 120 horas após a inoculação, em microscopia óptica, observa-se assim um aumento da área ocupada pela coloração azul, específica para a presença de fungos, à volta da zona de ferida em ambos os acessos, quando comparado com as mesmas amostras observadas 24 horas após a inoculação (Figura 4.1). Estes dados indicam que há um desenvolvimento do fungo, *C. gloeosporioides* ao longo do tempo, que se traduz num aumento de hifas e esporos. No entanto, verifica-se que a presença de fungo é maior no acesso J51, confirmando a sua maior susceptibilidade à infecção. Por microscopia electrónica de varrimento, também se observa, nas mesmas amostras, um aumento do número de hifas (Figura 4.2) com o tempo. Não obstante, ao fim de 120 horas de inoculação, em ambos os acessos, a maioria dos esporos ainda não se encontra germinada.

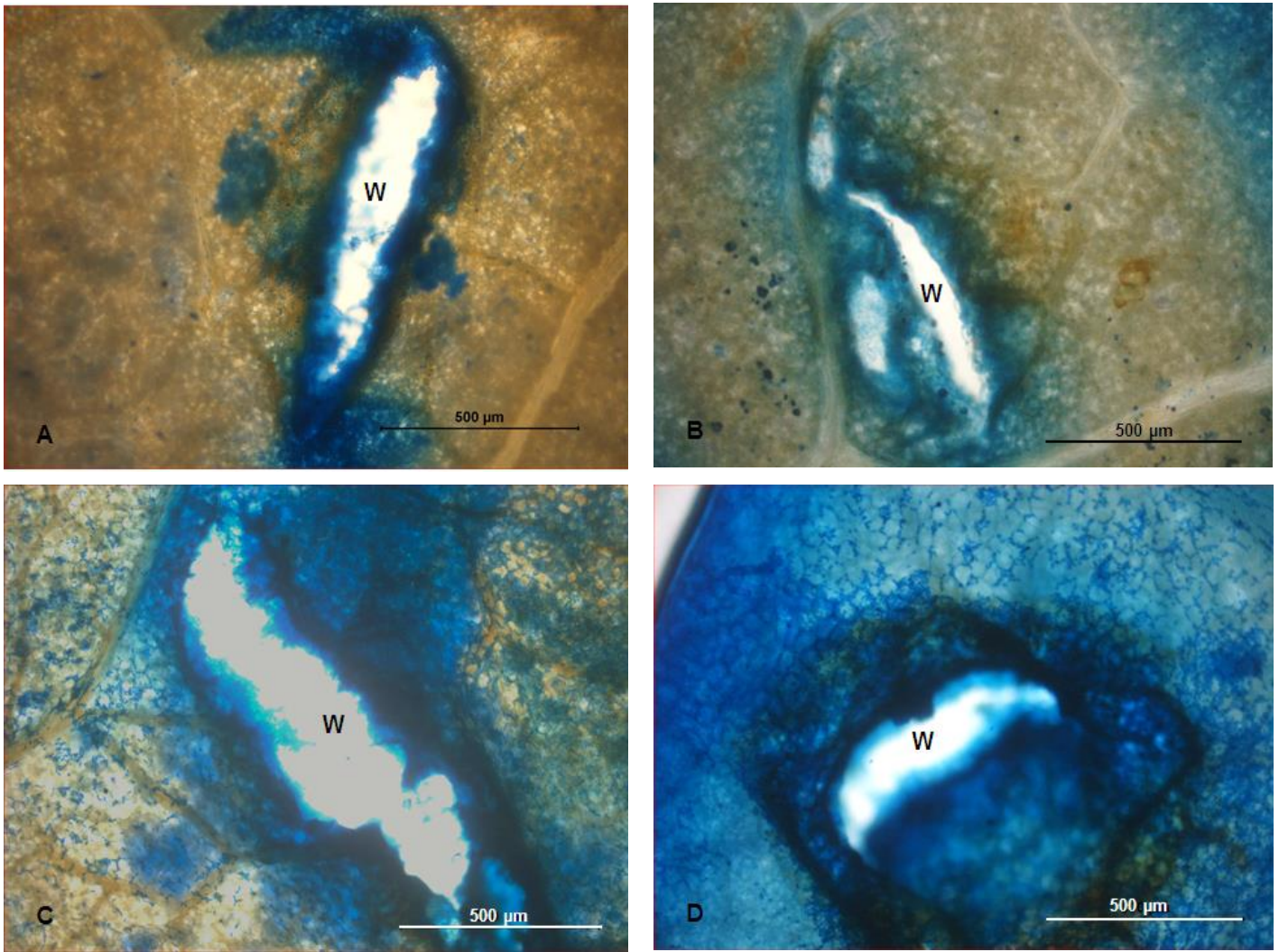


Figura 4.1. – Aspecto geral da infecção ao longo do tempo observado ao redor da lesão das folhas dos 2 Acessos de *J. curcas* testados, observado por microscopia óptica. A - Acesso J49, 24 horas após a inoculação; B - Acesso J51, 24 horas após inoculação; C - Acesso 49, 120 horas após inoculação e D – Acesso 51, 120 horas após inoculação; W- ferida.

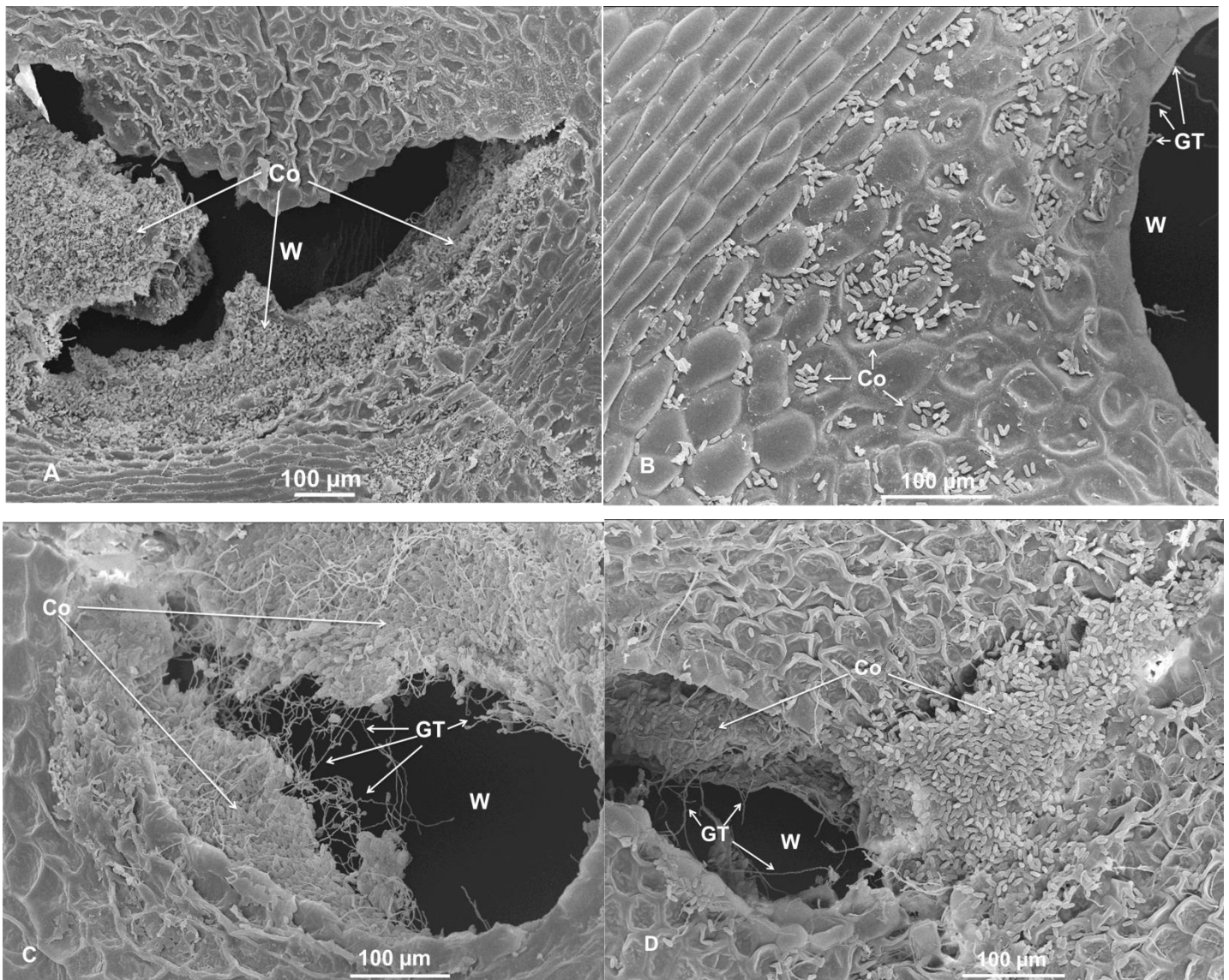


Figura 4.2 – Aspecto geral da infecção ao longo do tempo observado ao redor da lesão das folhas dos 2 acessos de *J. curcas* testados, observado por microscopia electrónica de varrimento. A - Acesso J49, 24 horas após a inoculação; B - Acesso J51, 24 horas após inoculação; C - Acesso 49, 120 horas após inoculação e D – Acesso 51, 120 horas após inoculação; Co – conídios; GT – Tubos germinativos e W- ferida.

Os esporos e as hifas concentravam-se e cobriam toda a zona da ferida tanto na face superior como inferior (Figura 4.3). Os esporos mais afastados da zona da ferida, dispunham-se de uma forma padronizada em volta dos sulcos das células vegetais formando losângulos visíveis em microscopia óptica (Figura 4.4).

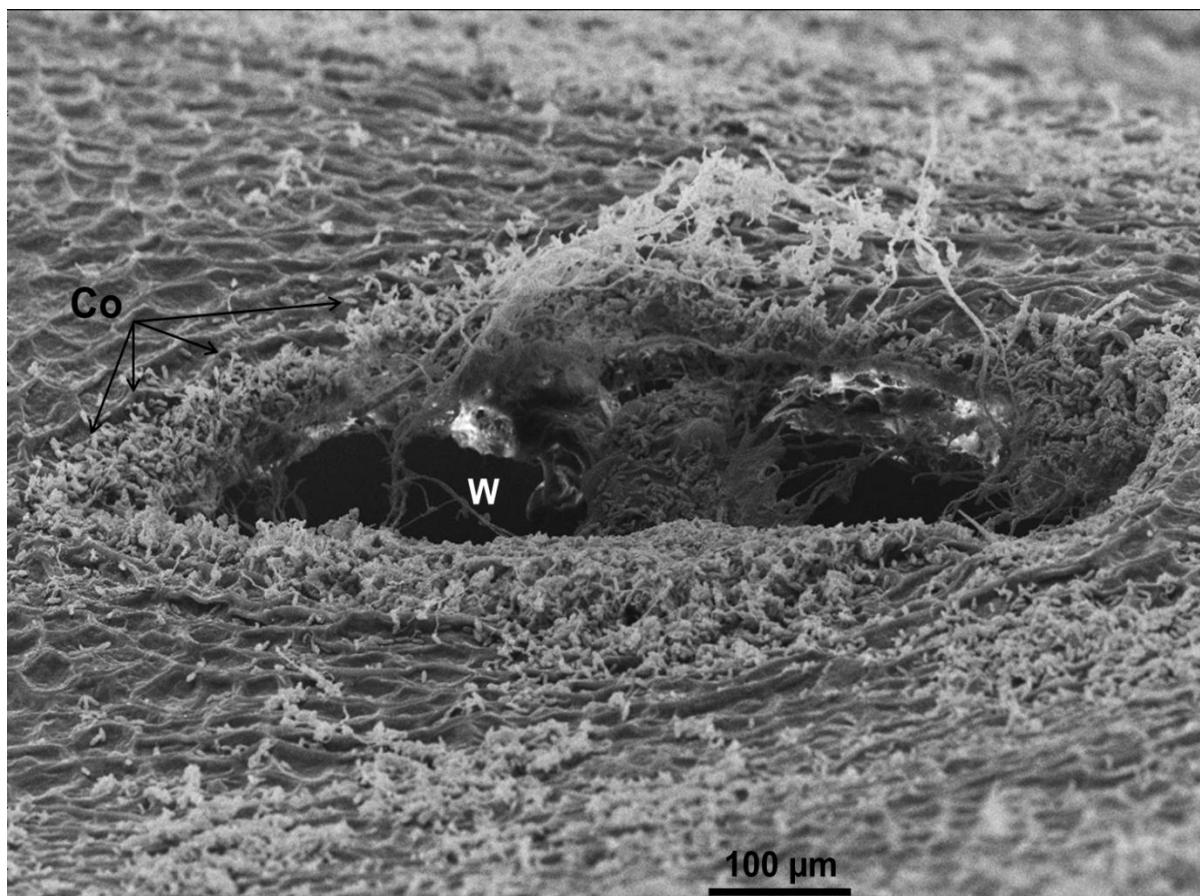


Figura 4.3 – Aspecto da disposição dos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* ao longo da ferida em folhas de *Jatropha curcas*, ao fim de 96 horas de incubação. Co - conídios e W - ferida.

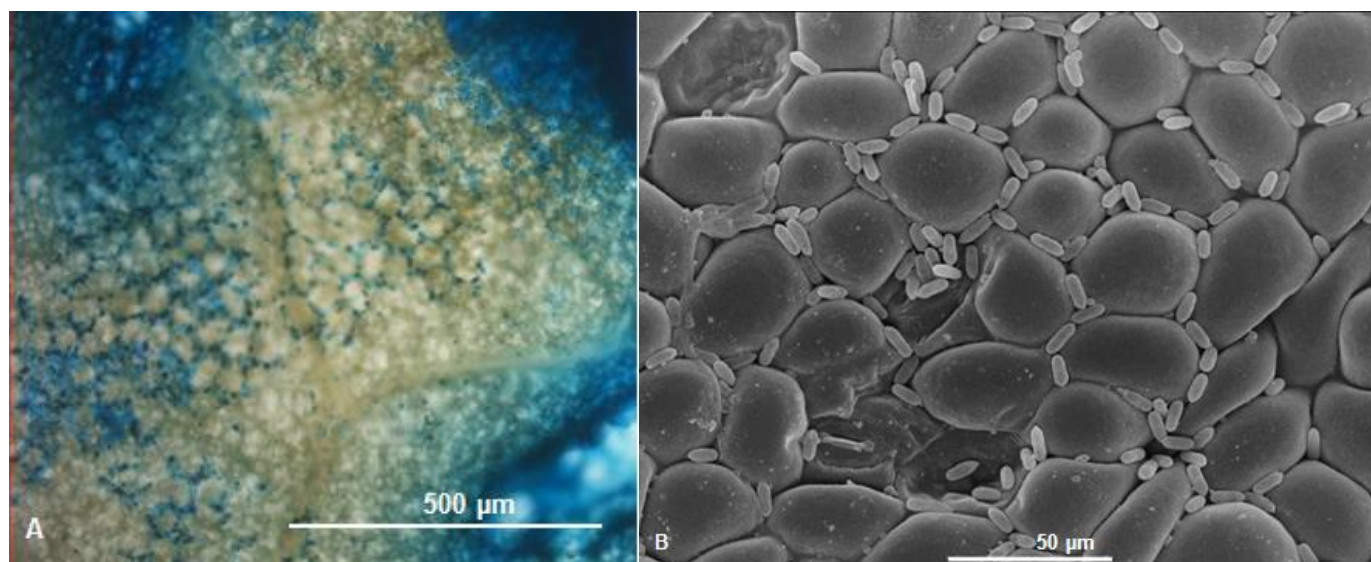


Figura 4.4 – Padrão de disposição dos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* na superfície da folha de *Jatropha curcas*, ao fim de 120 horas de incubação. A – observado em microscopia óptica e B – observado em microscopia electrónica de varrimento.

Não foram observados esporos sexuais pelo que o termo “esporo” se refere apenas aos conídios e, nesta dissertação, serão usados como sinónimos. Os esporos de *C.*

gloeosporioides (Figura 4.5) eram asseptados ou monosseptados transversalmente no centro, cilíndricos, ligeiramente alongados com uma extremidade arredonda e outra truncada. Os conídios mediam aproximadamente $11,1 \pm 0,8 \times 4,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (Tabela 4.1). Os conídios, quando germinavam, formavam 1 e apenas 1 tubo germinativo. Os tubos germinativos cresciam quer lateralmente quer a partir de uma das extremidades. Os tubos germinativos têm um comprimento muito variável, mas tendem a ser muito longos e não se ramificam antes da penetração. Mesmo com um número elevado de medições ($N = 80$), o coeficiente de variação do comprimento dos esporos é superior a 5% e, muito provavelmente, o comprimento do esporo poderá ter variado devido ao próprio processo mitótico como se observa na figura 4.6.B. Nesta microfotografia observa-se que os esporos se encontram em diferentes estágios mitóticos o que explica a observação de estruturas com diferentes comprimentos.

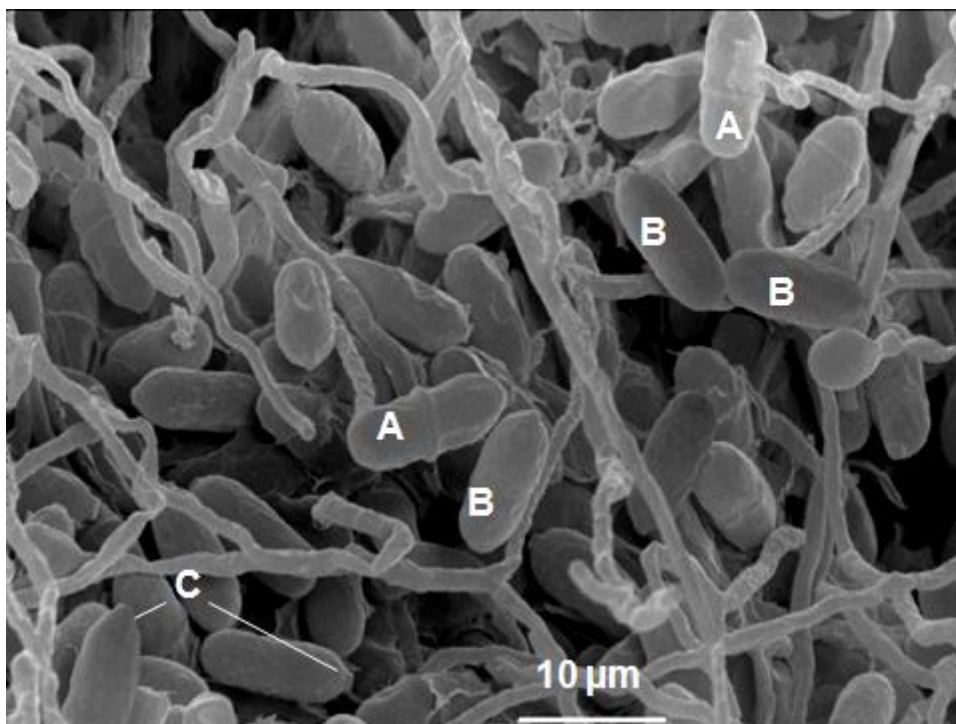


Figura 4.5 – Pormenor do aspecto dos esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*, ao fim 120 horas de incubação: A – Conídio septado e germinado; B – Conídio asseptado e C- Base truncada do conídio.

Tabela 4.1 – Dimensões dos conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* observados nas amostras recolhidas ao fim de 24 horas após a inoculação em ambos acessos de *Jatropha curcas*; N=80

	Comprimento (μm)	Largura (μm)
Mínimo	9,4	3,3
Máximo	12,8	4,8
Média	11,1	4,2
SD	0,84	0,31
C.V.	7,6	2,8

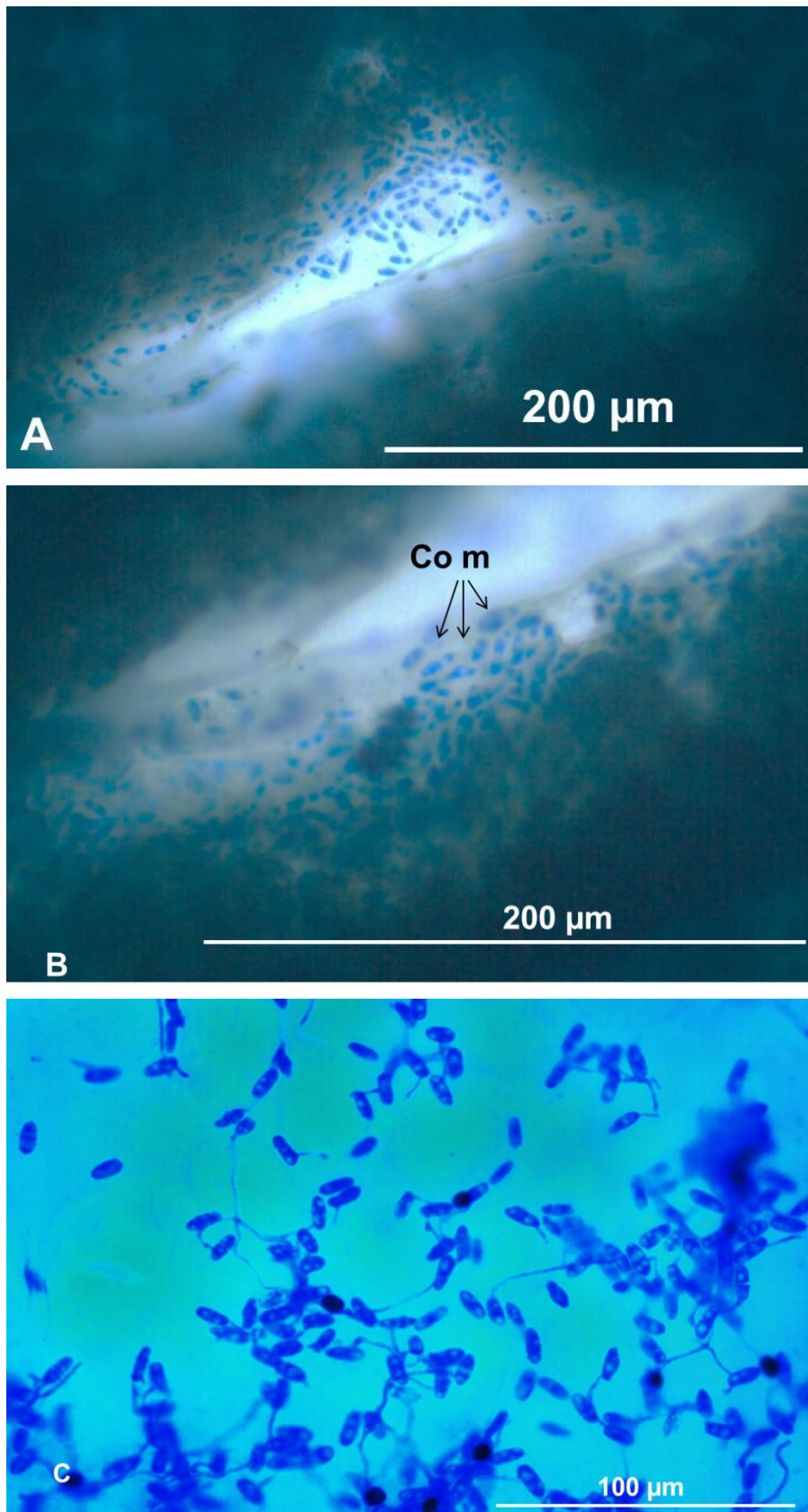


Figura 4.6 – Aspecto do desenvolvimento dos conídios ao longo do processo de infecção no acesso J51. A e B – Conídios observados 48 horas após inoculação e C – Conídios observados 120 horas após inoculação. Co m - conídios em mitose.

Com o objectivo de verificar se a geminação e o desenvolvimento dos esporos seria afectada pela presença de diferentes hospedeiros, foi efectuada uma contagem de esporos septados e não septados e o número de esporos germinados nos 2 acessos ao fim de 24 horas e 120 horas de incubação. Os resultados encontram-se nos gráficos das Figuras 4.7 e 4.8. e mostram que as percentagens de septação e germinação dos conídios diferem significativamente ($P < 0,001$) entre os diferentes acessos testados. O teste t às médias das percentagens de septação das amostras recolhidas ao fim de 24 horas de inoculação ($2,97 > 2,44$) e às médias dos valores das percentagens de septação para a amostras recolhidas ao fim de 72 horas de inoculação ($-7,46 < -2,3$) mostra que as médias diferem significativamente entre os 2 acessos. O teste t às médias das percentagens de germinação das amostras recolhidas ao fim de 24 horas de inoculação ($4,73 > 2,30$) e às médias das percentagens de germinação para a amostras recolhidas ao fim de 72 horas de inoculação ($-6,79 < -2,44$) mostra que as médias também diferem significativamente entre os 2 acessos.

Nas primeiras 24 horas após a inoculação, a septação dos conídios é baixa e o seu valor varia de 6% contabilizado no acesso J51 a 12,1% contabilizado no acesso J49. Observa-se um aumento da septação ao fim de 120 horas de inoculação, sendo bastante pronunciado no caso do acesso J51 em que a maioria dos esporos, 56,3%, encontra-se septada.

A taxa de germinação dos esporos acompanha o mesmo padrão de desenvolvimento dos septos nos esporos. A germinação dos esporos é inferior à septação dos mesmos. A germinação observada é baixa mas verifica-se um aumento ao longo dos 5 dias observados. Os esporos germinados contados ao fim das primeiras 24 horas de incubação no acesso J51 apresentam um valor médio de 2,8% que aumenta para 25,3% ao fim de 120 horas de incubação. Este aumento é muito superior ao observado no acesso J49 em que apenas aumenta de 5,9% para 8,6% no mesmo período de tempo. Por cada 2 esporos septados existe aproximadamente um germinado, esta é a relação estabelecida entre a germinação e septação dos esporos. Mas convém esclarecer que a contagem dos septos é facilitada, pois os septos em tornos dos esporos são visíveis de quase todos os ângulos enquanto que a observação de um tubo germinativo a brotar do esporo só é visível em certos ângulos pelo que a contagem dos esporos germinados pode estar ligeiramente subvalorizada.

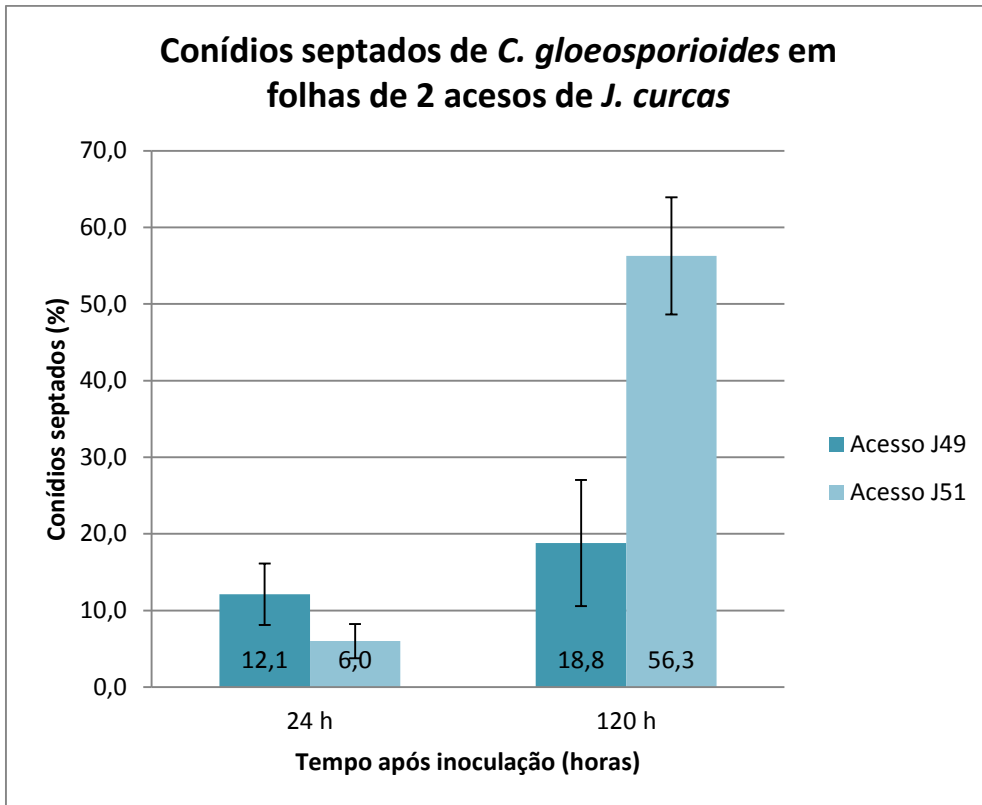


Figura 4.7 – Percentagem de conídios septados observados nos acessos J49 J51, 24 e 120 horas após a inoculação. Pelo menos 100 esporos foram contados por amostra em 5 amostras.

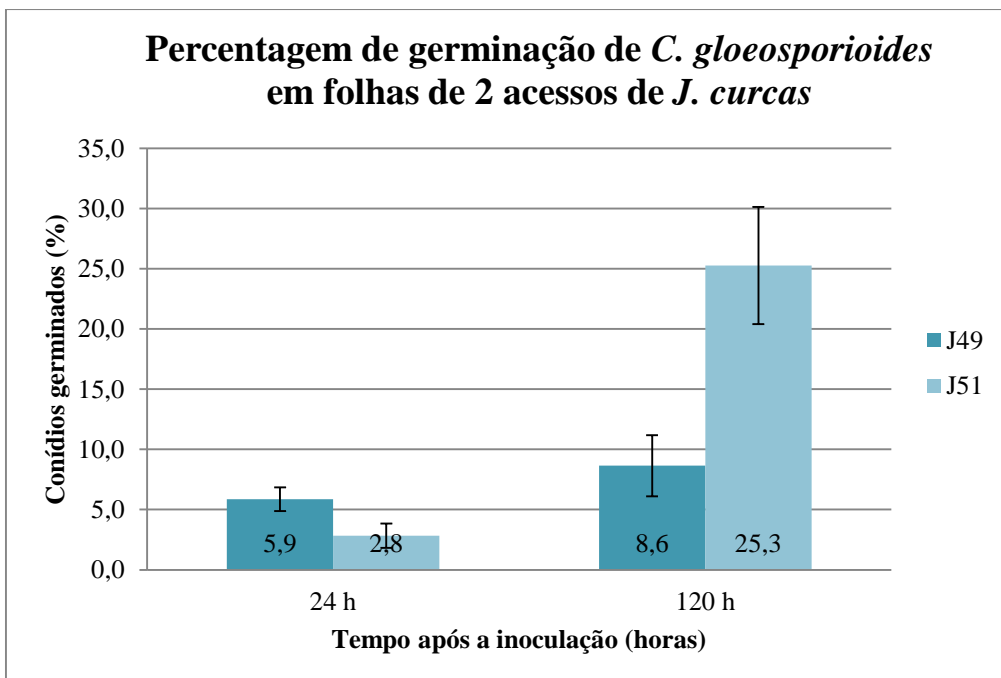


Figura 4.8 – Percentagem de germinação observada nos acessos J49 e J51, 24 e 120 horas após a inoculação. Pelo menos 100 esporos foram contados por amostra em 5 amostras.

Na Figura 4.9 podem ser observados tubos germinativos na vizinhança de estomas. Não foram observados tubos germinativos a entrarem nem a se dirigir para os estomas, o que sugere que o mecanismo de entrada se efectua nos tecidos lesionados ou directamente pela cutícula.

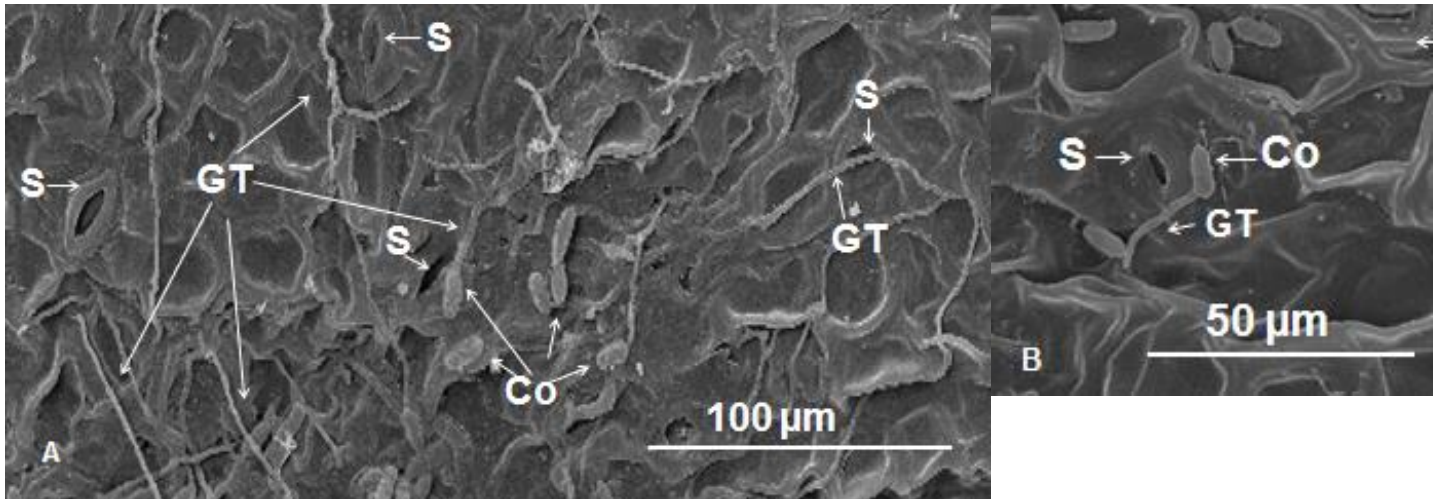


Figura 4.9 – A e B – Observação do comportamento das hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* em relação aos estomas das folhas de *Jatropha curcas*. Co – conídio; germinado; GT – tubos germinativos; S- estomas.

Foram observados apressórios (Figura 4.10), estruturas em forma de balão e cor acastanhada, nas pontas de alguns tubos germinativos. Os apressórios maduros aparecem mais frequentemente em ambos acessos aos 4 e 5 dias após a inoculação. Os apressórios mais imaturos são mais pequenos e apresentam a cor do corante usado (Figura 4.10B).

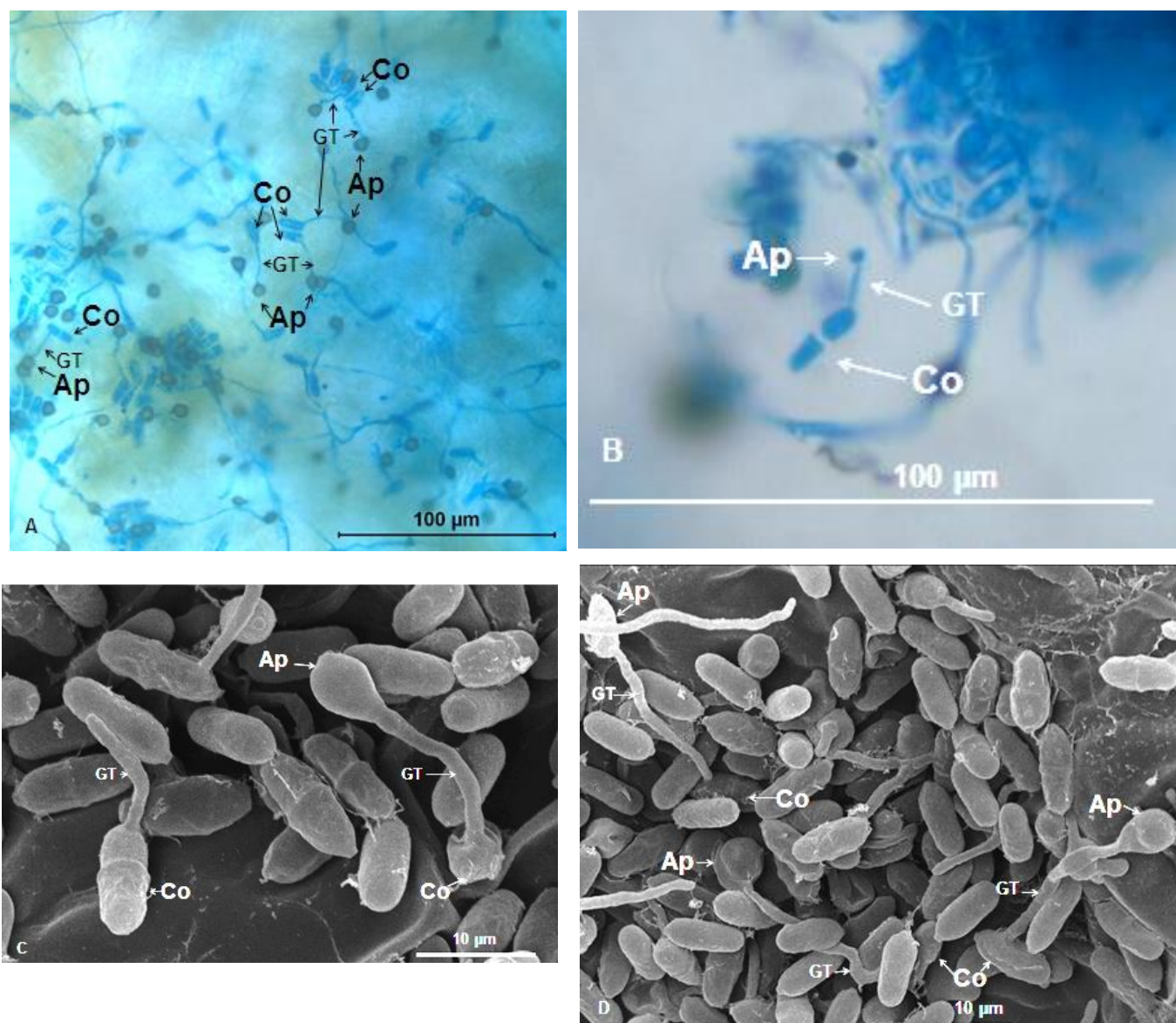


Figura 4.10 – Aspecto dos apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de *Jatropha curcas*: A e B – observados através de microscopia óptica; C e D – por microscopia electrónica de varrimento. Ap – apressório; Co – conídio; GT – tubo germinativo.

4.2. Expressão de genes candidatos à resistência à antracnose

Com objectivo de investigar o papel da transcrição de alguns membros de famílias de genes candidatos a ser responsáveis pela resistência diferencial à antracnose entre acessos, foram seleccionados alguns genes candidatos com função de defesa em plantas e a sua expressão relativa foi quantificada.

Os *primers* das sequências nucleotídicas usados para a expressão génica foram desenhados neste trabalho a partir de sequências depositadas nas bases de dados para esta espécie e estão listados na tabela 4.2. Os *primers* para serem adequados a ensaios de PCR quantitativo

deverão ter uma eficiência que varia entre 90% a 110%, em cálculos onde o R^2 é superior a 99 (Fraga *et al.*, 2008). A maioria dos *primers* revelou eficiência de amplificação superior a 88,21% (tendo-se calculado um máximo de 111,58%) e apenas num caso foi observado um ajustamento da recta (R^2) inferior, mas muito próximo de 0,99.

Tabela 4.2 – Lista de *primers* usados e as eficiências obtidas. Fwd - forward primer; Rev – Reverse primer.

Gene	ID do gene	Sequência do <i>primer</i> (5-3')	Tamanho ampliação (pb)	C_t	R^2	Eficiência Em %	Eficiência Por ciclo
<i>Curcina "a"</i>	FJ357424.1	Fwd:GGATTTAGGAGTGGTGGCATTGG Rev:AATCTTGCTGCCTCTGGAACC	120	22,97 ± 0,25	0,9954	90,14	1,90
<i>Curcina "b"</i>	Jcr4U30724.10	Fwd:GGTGGCTACATGGTTTTGCTGG Rev:AACGGAATCAGCTGTGTACTGG	105	29,30 ± 0,39	0,9911	111,58	2,00
<i>Quitinase III "a"</i>	Jcr4S00001.180	Fwd: ATGGCTGCACTGGTTAAGCG Rev: TACCGCTACCACCGCCAATAG	87	24,16 ± 0,04	0,9987	105,49	2,00
<i>Quitinase III "b"</i>	Jcr4S00001.190	Fwd: TTGGAATAGATGGACCGCATCG Rev: ATATACCCACTTCCGGCTGCC	87	24,93 ± 0,03	0,9940	117,28	2,00
<i>JcPR-10a</i>	JN566052.1	Fwd:TGAACGCAAGATTGCTTCTCC Rev:CGACCCCTGGAAGGATTTAG	98	21,05 ± 0,08	0,9995	88,21	1,88
<i>JcPR-b</i>	Jcr4S00918.30	Fwd: GGCATTGGGGTTACATGGAAGG Rev: ATGAGGCCTCCAAGCAATTCG	157	27,00 ± 0,17	0,9814	93,61	1,94
<i>cAPX</i>	FJ619044.1	Fwd:ATGCTGCTAACACTGGGCTTG Rev: AACAGCAACAACACCAGCGAG	113	25,51 ± 0,10	0,9876	102,15	2,00
<i>tAPX</i>	KF560416.1	Fwd: CTTCTCGCCTTCTCCCTCCG Rev: AGGAGGAGGAGGAGGAGAGAG	102	27,26 ± 0,07	0,9970	105,80	2,00

Para as sequências referentes à *curcina "c"* (Jcr4S02263.20) foram desenhados 3 pares de primers e para *JcPR-c* (Jcr4S03620.40), 2 pares de primers. A amplificação de 90 ng de cDNA com estes primers fez-se apenas a C_t superiores a 30, o que revela baixa expressão, não permitindo ainda determinar a eficiência dos *primers* com rigor. A expressão génica não foi então quantificada para estes membros, uma vez que os resultados indicam que estes genes são expressos em taxas muito baixas nos tecidos da folha de *J. curcas*, nas condições do ensaio. Os primers testados constam da tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Lista de primers usados para os genes da curcina “c” e JcPR-c. Fwd - forward primer, Rev – Reverse primer.

Gene	ID do gene	Sequência do primer (5-3')	Tamanho ampliação (pb)	Ct
<i>Curcina “c”</i>	Jcr4S02263.20	Fwd: TGAAGGTCTGGGTTGTGGTGG Rev: TACAGAGGGAATTGCATCGACTG	116	32,38± 0,76
		Fwd: CGACATGGTTGAGCTGGACTG Rev:AGGGAATTGCATCGACTGTATGG	90	31,41 ±0,86
		Fwd: GTCTGGGTTGTGGTGGCGAC Rev: AGCTTACAGAGGGAATTGCATCG	115	32,31 ± 0,42
<i>JcPR-c</i>	Jcr4S03620.40	Fwd: ATGGCAAAGAAGGAGGGACAG Rev CGTCGTCTCCGCTTCTTCATTC	87	32,86 ± 0,40
		Fwd: CAGCAGAAGAGACGTTGAGGC Rev: CGGTGGTCCAGAGTAAACAGC	179	32,93 ± 0,22

Por outro lado, os primers desenhados com base nas sequências das quitinases tipo III Jcr4U35651.10, Jcr4S00022.50, Jcr4S00022.40, Jcr4S00022.110 não amplificaram cDNA mas amplificaram amostras de DNA genômico nas condições experimentais descritas. Como, estas quitinases são expressas no DNA genômico e não no cDNA das folhas, conclui-se que estes genes não são expressos nas folhas de *J. curcas*. Os primers usados contam da tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Lista de primers de quitinases usados que não se expressam em folhas. Fwd - forward primer, Rev – Reverse primer.

Primer	ID do gene	Sequência do primer (5-3')	Tamanho ampliação (pb)
<i>Quitinase tipo III “c”</i>	Jcr4U35651.10	Fwd: GCCATTGCGATCCGTACAGC Rev: CCCGCTCCTCCACCAATAGAC	106
<i>Quitinase tipo III “d”</i>	Jcr4S00022.50	Fwd: CCTTGCTGGCCATTGTGATCC Rev TCCCTGCTCCTCCTCCGATAG	110
<i>Quitinase tipo III “f”</i>	Jcr4S00022.40	Fwd: TCCTCCTTGCCAATACACCTCTG Rev: AGCTTGAGGAGATGCAGGTAAC	118
<i>Quitinase tipo III “d”</i>	Jcr4S00022.110	Fwd: TCTACCCGAAAGCTGCCACTC Rev: CTCTCGTCCTGGCCCAATAC	100

Os primers dos genes de referência usados neste trabalho encontram-se na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Lista de primers dos genes de referência e as eficiências obtidas. Fwd - forward primer; Rev – Reverse primer.

Gene	ID do gene	Sequência do primer (5-3')	Tamanho amplificação (pb)	C _t	R ²	Eficiência em %	Eficiência Por ciclo
<i>Actina</i>	Jcr4S06558.10	Fwd: AGGTTGAGACTGCCAAGAG Rev: CGGAATCTCTCAGCTCCAATCG	90	26,66 ± 0,51	0,9954	99,28	1,99
<i>GADPH</i>	Jcr4U29393.10	Fwd: GGAAGTGGAGAGGTGGAAGAGC Rev: GCCATTCCAGTAAGCTTGCCG	114	23,82 ± 0,28	0,9934	90,24	1,90
<i>TUB5</i>	GW878948.1	Fwd: TCTTACACGTTTCAGGGAGGCC Rev: CATCTCCGCTGTACCTTCCGG	108	28,26 ± 0,65	0,9900	106,95	2,00

De modo a investigar se a tolerância contrastante se deve à expressão basal diferencial, verificou-se se haveria diferenças nos valores obtidos nas amostras recolhidas no tempo zero, sem fermento e sem inoculação. Partindo da mesma quantidade de cDNA em ambos os genótipos, verificam-se C_t semelhantes (de acordo com o teste t-Student) entre os 2 acessos no tempo zero (Tabela 4.6), excepto no caso das quitinases em que a expressão é maior no acesso J51, classificado como susceptível no gene *quitinases III "a"*, os valores diferem em cerca de 3 C_t entre si (p < 0,01), o que é significativo e, no gene *quitinase III "b"*, em cerca de 1,5 C_t (p < 0,05). Em todos os outros casos, a expressão antes da progressão da infecção não variou em função da origem do material vegetal usado.

Tabela 4.6 – C_t de amostras com 90 ng de DNA recolhidas sem incubação, tempo 0, correspondente à expressão basal para cada gene. * = diferenças estatisticamente significativas

Gene	C _t inicial ao T0 (média ± desvio padrão)	
	Acesso J49	Acesso J51
<i>Curcina "a"</i>	28,96 ± 0,61	28,24 ± 0,72
<i>Curcina "b"</i>	28,06 ± 0,73	28,32 ± 0,63
<i>Quitinase "a"*</i>	27,67 ± 0,56	24,58 ± 0,67
<i>Quitinase "b"*</i>	28,07 ± 0,57	26,41 ± 0,78
<i>JcPR-10-a</i>	20,06 ± 0,73	20,84 ± 0,60
<i>JcPR-b</i>	28,40 ± 0,67	27,74 ± 1,33
<i>cAPX</i>	22,21 ± 0,61	22,61 ± 0,82
<i>tAPX</i>	25,53 ± 0,51	25,32 ± 0,80

Os resultados da quantificação da expressão génica de membros de famílias candidatas ao envolvimento na resistência de plantas a doenças fúngicas encontram-se representados nos gráficos seguintes. Foi mensurada a expressão de 2 membros da família das curcinas (Figura 4.11 e 4.12), 2 quitinases do tipo III (Figura 4.13 e 4.14), 2 proteínas relacionadas com a

patogénese (Figura 4.15 e 4.16) e 2 peroxidases de ascorbato (Figura 4.17 e 4.18) em folhas de um acesso de *J. curcas* classificado como susceptível (J51) e um classificado como resistente (J49) à antracnose. A expressão foi medida em amostras recolhidas em 30 pontos de inoculação, ao longo de 3 dias de infecção, isto é, até 72 horas após a inoculação. As amostras incluem dois tipos de tratamento:

- O primeiro tratamento envolve a inoculação com um disco de micélio com esporos de *C. gloeosporioides* sobre a ferida, designada nos gráficos com “Ferida & Inóculo”;
- No segundo tratamento o disco de micélio é substituído por um disco de meio PDA esterilizado que é depositado igualmente sobre a ferida e designado nos gráficos “Apenas ferida”.

Foram seguidas 2 abordagens para o tratamento dos resultados obtidos da expressão génica relativa. Para cada gene, o primeiro gráfico indica a variação da expressão génica ao longo do tempo em que as medições das amostras recolhidas ao fim de 8, 24, 48 e 72 horas de incubação estão representadas como variação de expressão em função das amostras recolhidas, sem ferimento e sem inoculação e sem incubação, designadas como tempo zero (T0).

O 2º gráfico para cada gene, mostra a variação da expressão génica devida à presença do fungo, após normalização de dados para retirar o efeito do ferimento. Nesta abordagem, as medições da quantificação relativa da expressão génica para o tratamento “Ferida & Inóculo” estão representadas como variação de expressão em função do tratamento “Apenas ferida” para cada tempo de incubação.

A expressão génica de *curcina “a”* (Figura 4.11) mostrou uma indução da expressão muito acentuada nos tratamentos correspondentes a amostras com ferimento e sem inoculação. Esta sobre-expressão foi máxima no primeiro ponto amostrado (8 horas após o ferimento) mas mostrou uma tendência de diminuição ao longo do tempo em ambos acessos, embora às 72 horas se mantenha em níveis de 3-4 vezes (em \log_2) superiores ao controlo. Tal indica que o gene é regulado positivamente em resposta ao ferimento dos tecidos foliares. Os valores negativos observados no gráfico da Figura 4.11B confirmam a presença de esporos de *C. gloeosporioides* atenua este efeito e induz uma repressão do gene. Contudo, é de salientar que às 72 horas após inoculação, a expressão deste gene no genótipo resistente (J49) deixa de ser significativamente diferente nos dois tipos de tratamento.

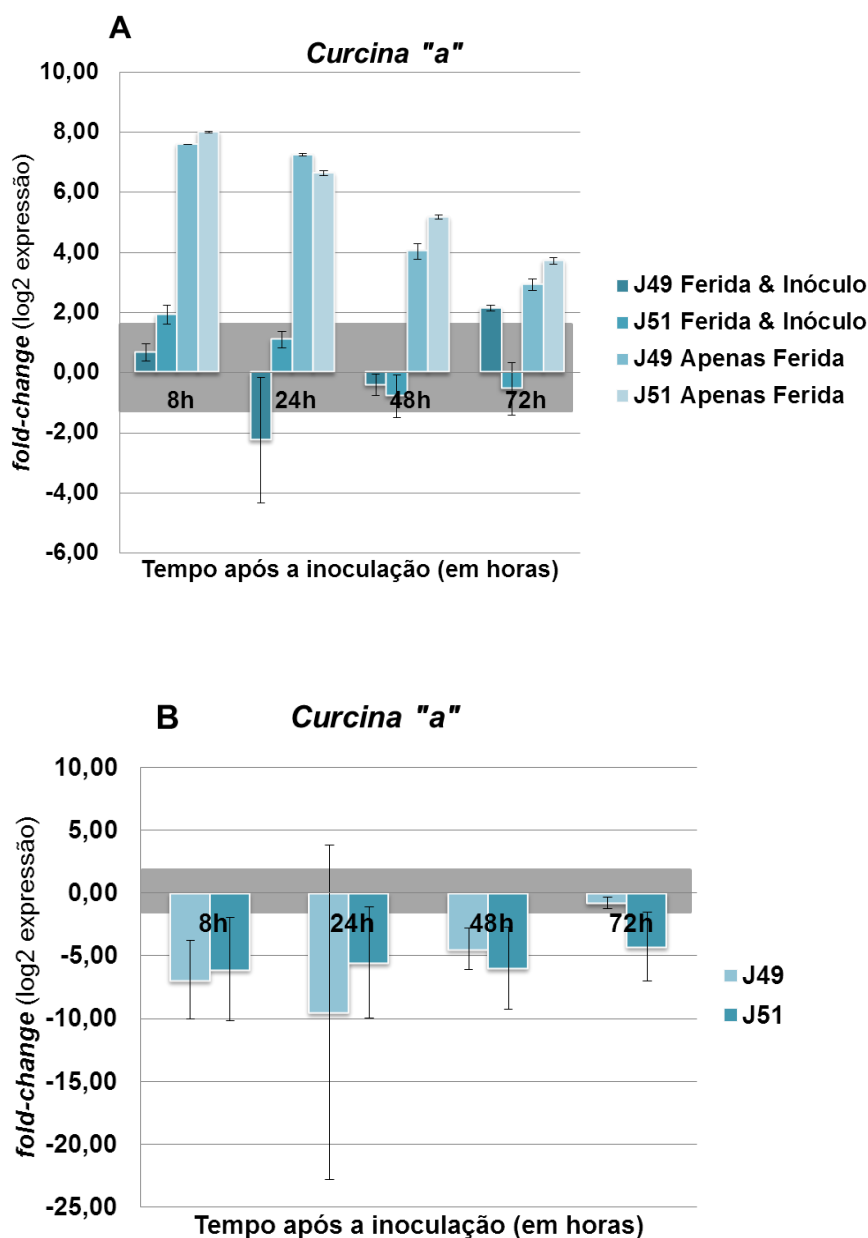


Figura 4.11 – Expressão relativa do gene *Curcina "a"* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

O gene da *curcina "b"* (Figura 4.12) não seguiu o mesmo padrão de expressão que a *curcina "a"* e sofreu menos alterações na sua acumulação em relação à expressão basal. A expressão deste gene é tendencialmente reprimida, sobretudo, a partir das 24 horas após a inoculação. Destaca-se que o gene é significativamente inibido em resposta a ferimentos inoculados e distinto do efeito causado pela ferida no acesso J49, 24 horas após a inoculação, recuperando para níveis considerados não diferentes do controlo nos tempos subsequentes. Pelo contrário, a partir das 48 horas após a inoculação, a expressão do gene é reprimida no genótipo

suscetível. No entanto, considerando o efeito do ferimento, esta diferença não varia da resposta ao ferimento (4.12 B).

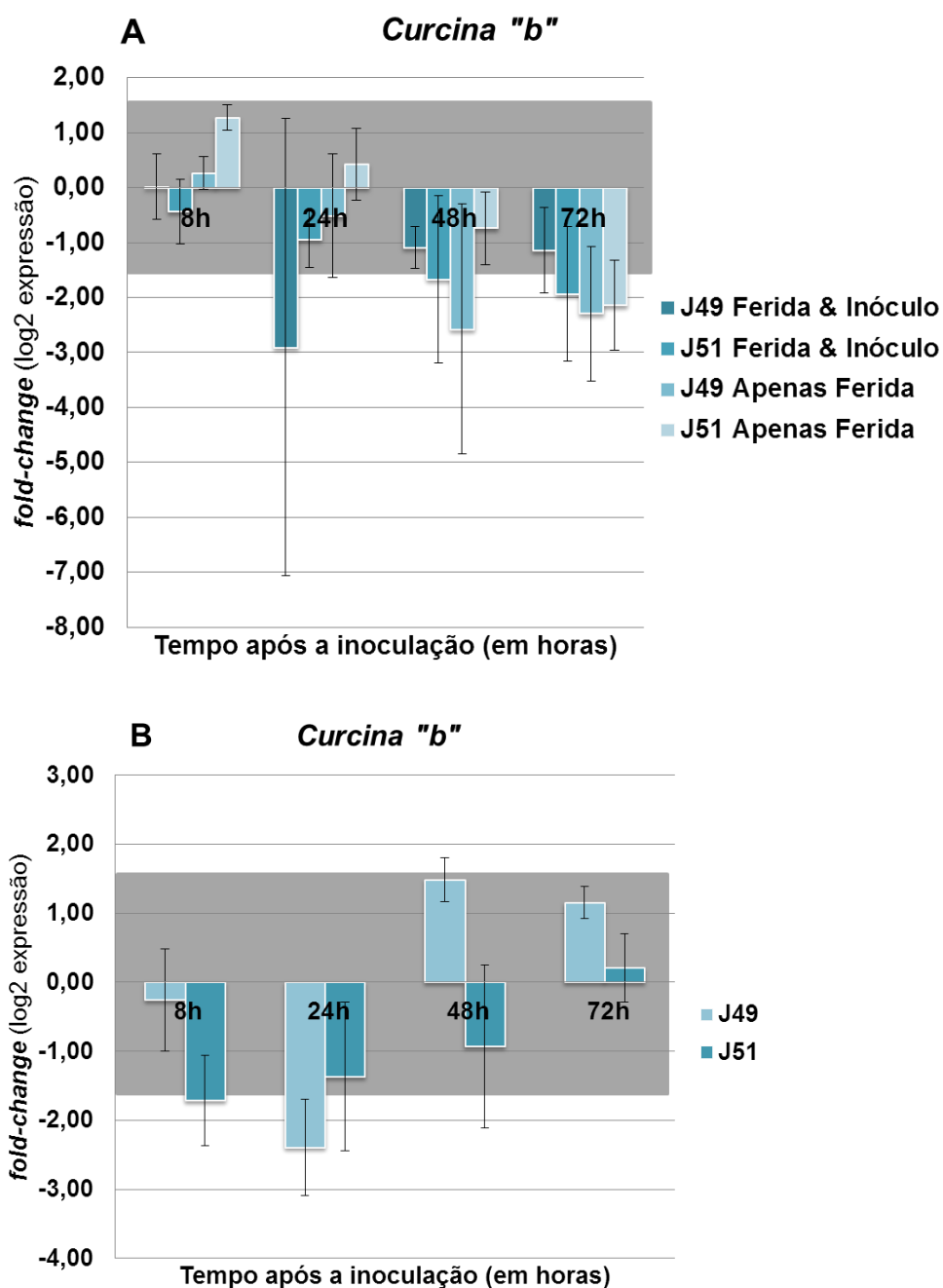


Figura 4.12 – Expressão relativa do gene *Curcina "b"* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

A expressão da *quitinase III "a"* (Figura 4.13) foi estatisticamente superior no acesso J49 após os 2 tipos de tratamento (ferimento inoculado ou não inoculado) do que no acesso J51. No acesso J49, a expressão do gene no tratamento "ferida e inóculo", embora inferior, aproximou-se contudo da expressão no tratamento onde as folhas foram apenas feridas.

Pelo contrário, no acesso J51, susceptível à antracnose, os níveis de expressão do gene foram aproximadamente igual à basilar no tratamento "ferida e inóculo". Contudo, no tratamento de "apenas ferida", a expressão aumentou em relação ao tempo zero e entre as 24 horas e as 48 horas após incubação, aproximando-se mesmo à do acesso J49 em amostras analisadas 24 horas após os tratamentos.

Verificou-se que nas amostras do acesso J51 recolhidas 24 e 48 horas após a inoculação, a variação da expressão génica em relação aos dois tipos de tratamentos foi negativa. No entanto, a expressão no tratamento "apenas ferida" é significativamente superior do que no tratamento "ferida e inóculo".

Conclui-se que a expressão da *quitinase III "a"* é superior no acesso resistente (J49), embora essa expressão seja devida à resposta ao ferimento.

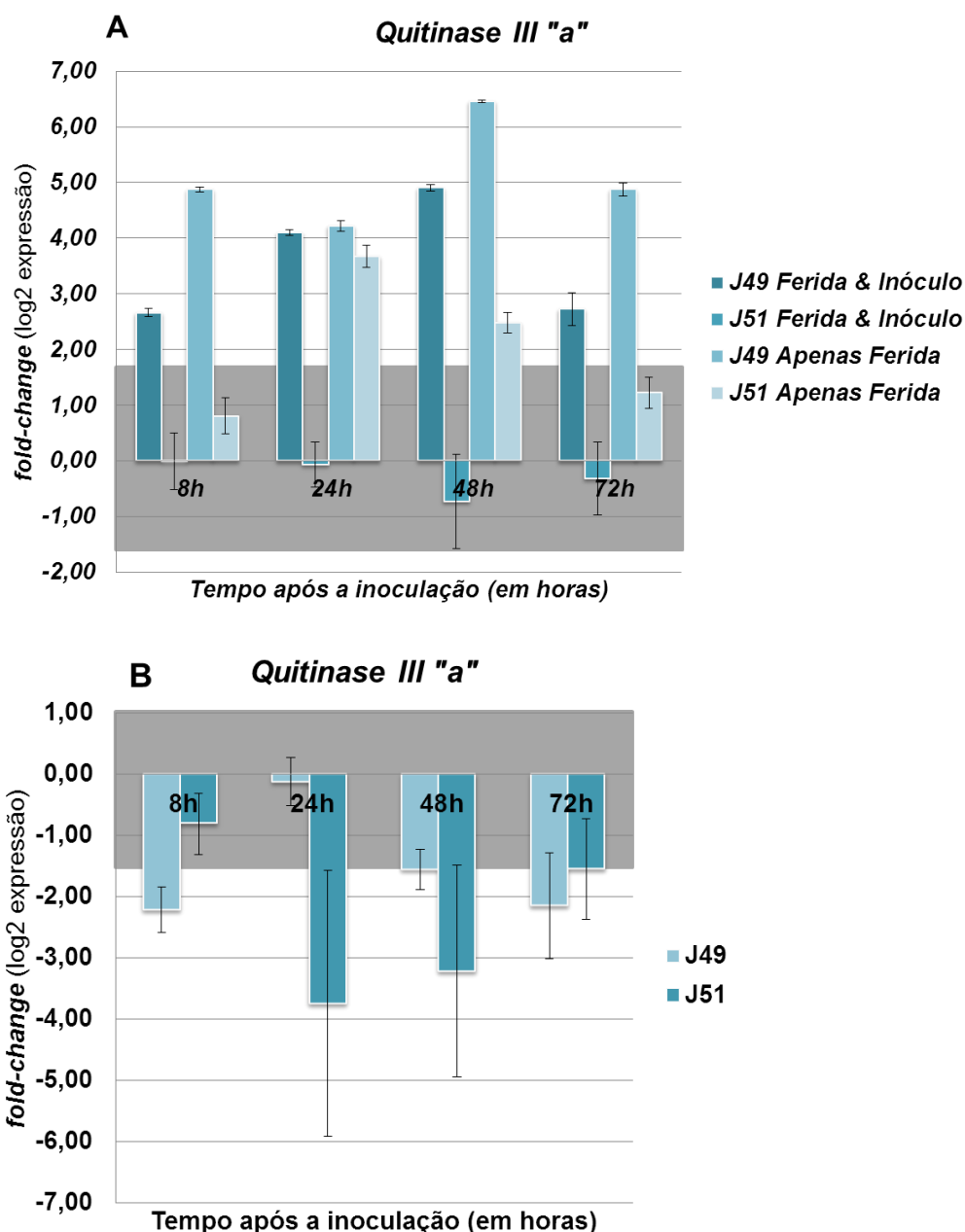


Figura 4.13 – Expressão relativa do gene da *Quitinase III "a"* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

O padrão de expressão do gene da *quitinase III "b"* (Figura 4.14) mostrou uma tendência semelhante ao gene *quitinase III "a"*, embora os efeitos verificados como resposta ao inóculo tenham sido antecipados em cerca de 24 horas.

De facto, em comum, a expressão dos genes das quitinases do tipo III apresentou valores superiores no acesso J49 que são significativamente superiores em amostras recolhidas ao longo das 72 horas após a inoculação do fungo, embora essa expressão seja resultado da

indução de fermento. A presença de inóculo reprime mais esta tendência no genótipo J51, com variação temporal de acordo com o membro de quitinase específico.

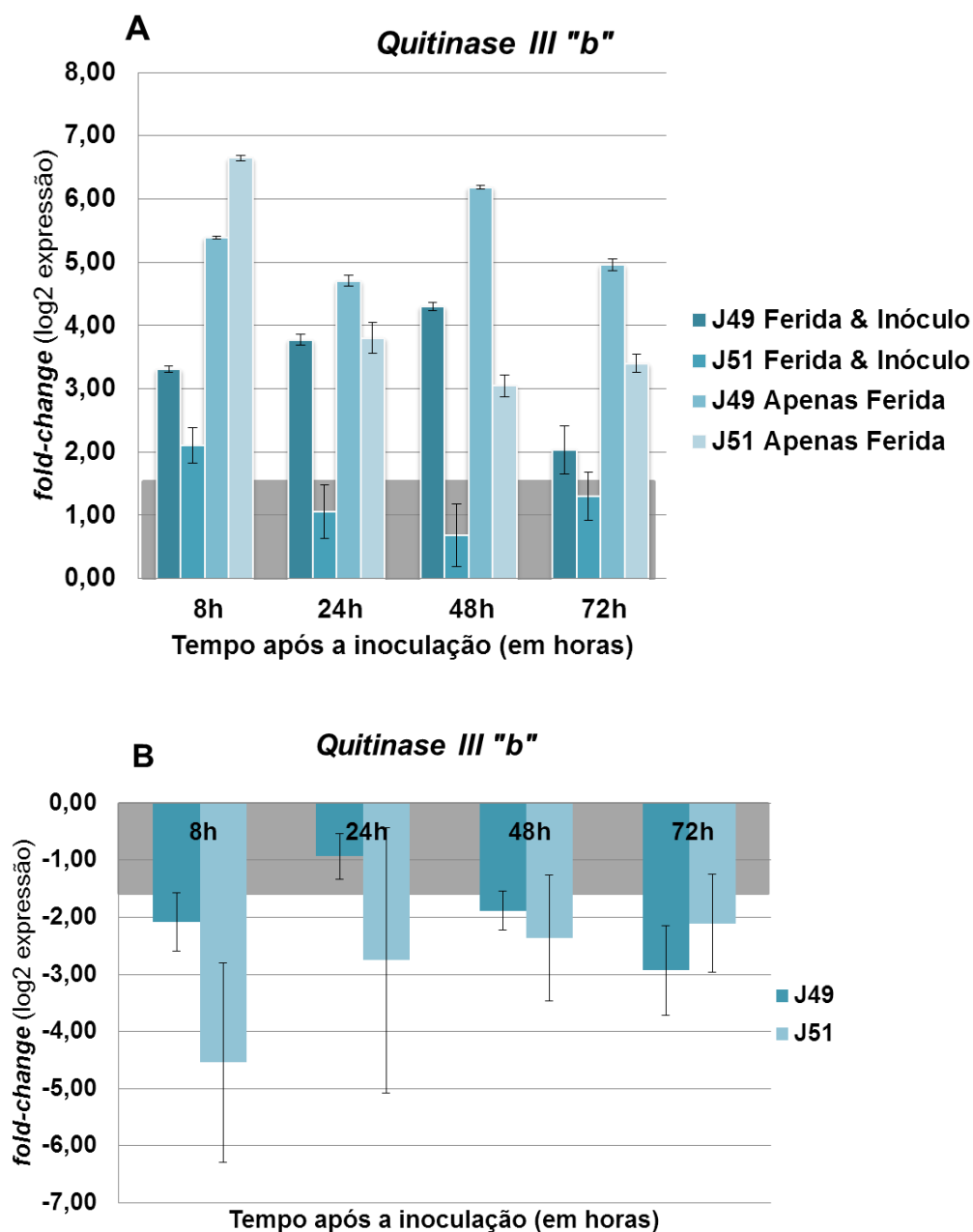


Figura 4.14 – Expressão relativa do gene *Quitinase III "b"* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

A expressão do gene *JcPR-10a* não sofreu alterações significativas em relação à expressão basal (Figura 4.15 A) e as diferenças da expressão provocadas pelo fungo são também pouco

significativas (Figura 4.15 B), o que sugere que este gene não será responsável pelas diferenças na tolerância da *J. curcas* à antracnose ao nível foliar.

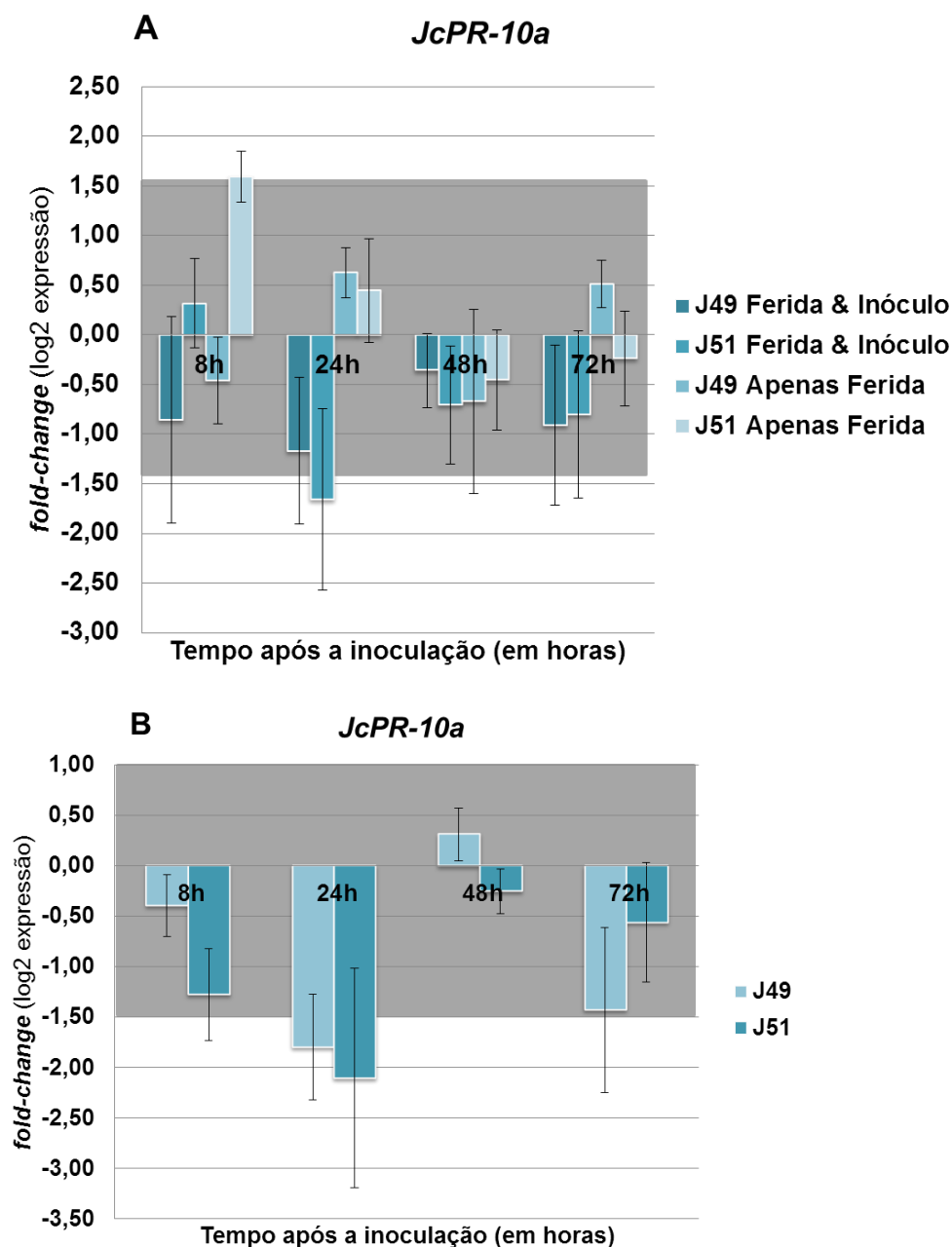


Figura 4.15 – Expressão relativa do gene *JcPR-10a* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 h de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

Pelo contrário, a expressão do gene *JcPR-b* (Figura 4.16) aumentou significativamente no acesso J49, tanto no tratamento ferida como no tratamento em que a ferida foi inoculada ao fim de 24 horas de incubação, com níveis de expressão aproximadamente iguais. Observa-se que

no acesso J51 na amostra recolhida após 24 horas de incubação a diferença de *fold change* entre os 2 tipos de tratamentos é significativa e às 72 horas observa-se uma repressão significativa da expressão do gene no tratamento apenas ferida

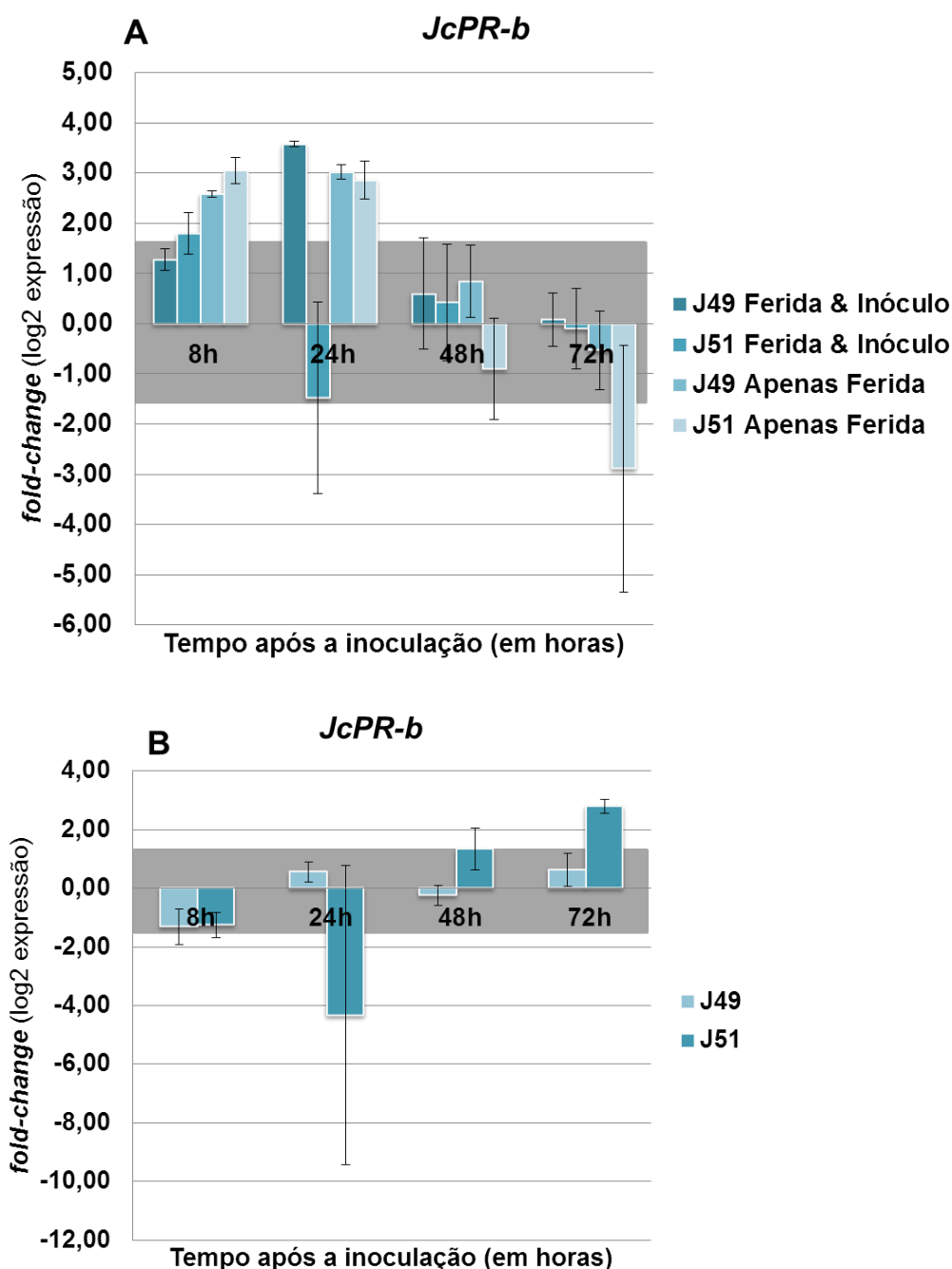


Figura 4.16 – Expressão relativa do gene *JcPR-b* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

Quanto à expressão do gene da peroxidase de ascorbato citosólica, *cAPX*, (Figura 4.17), podemos concluir pelos níveis de variação relativamente ao controlo, que não há diferenças significativas, o que desenfaz o seu papel nos mecanismos em estudo.

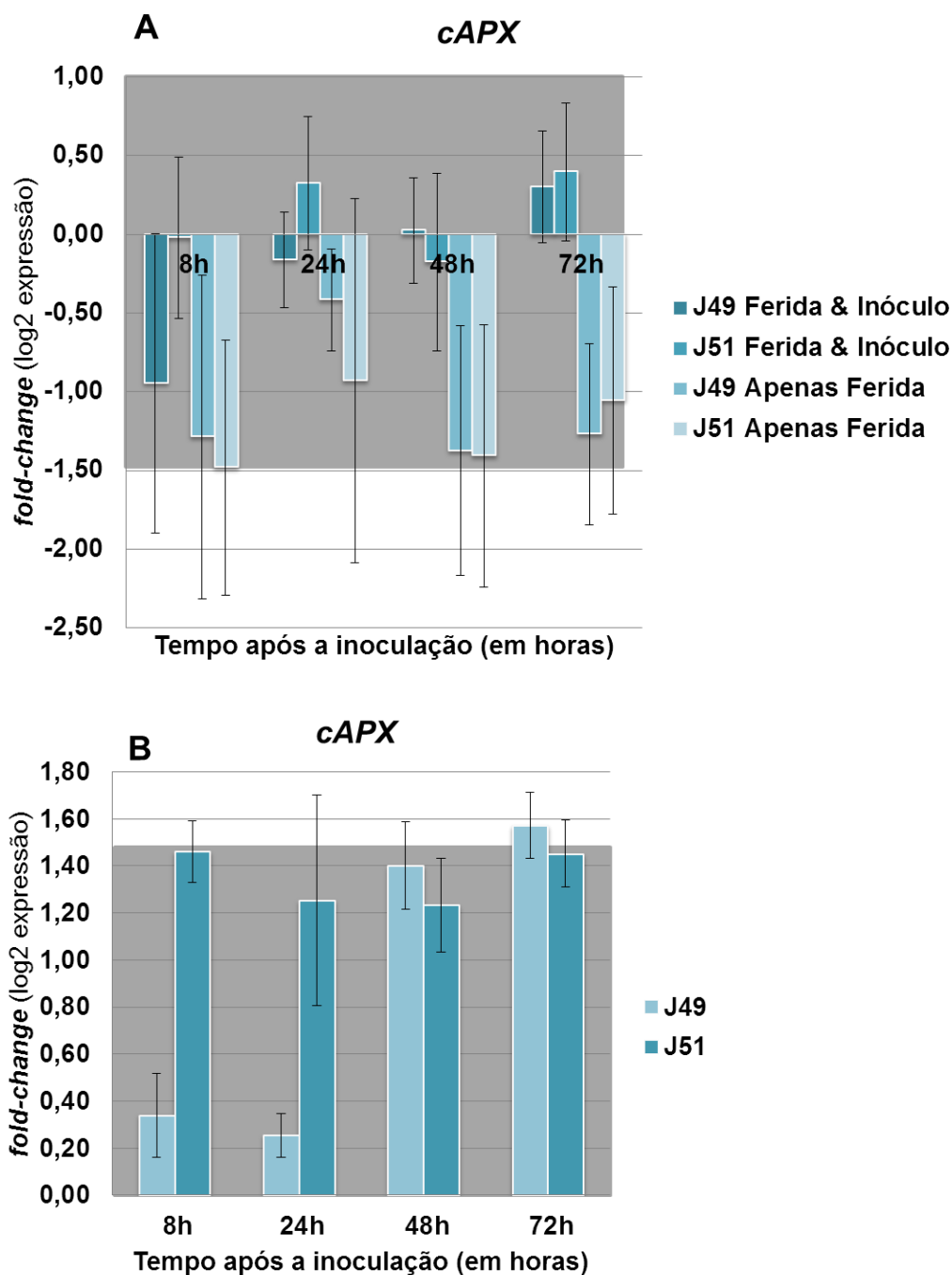


Figura 4.17 – Expressão relativa do gene *cAPX* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

No caso da expressão do gene da peroxidase de ascorbato tilocoidal, *tAPX*, (Figura 4.18) ao fim das 8 e 48 horas após incubação, verificou-se uma significativa repressão da expressão do gene no tratamento onde a folha foi sujeita apenas a ferimento. Todavia, apenas em amostras recolhidas após 8 horas de incubação a diferença da expressão génica entre os 2 tipos de tratamentos foi realmente significativa (isto é, com um fold-change superior a 2) em ambos acessos. Neste tempo, a maior expressão no genótipo susceptível sugere que este está em condições de maior stress oxidativo, necessitando de maior protecção enzimática contra as ROS.

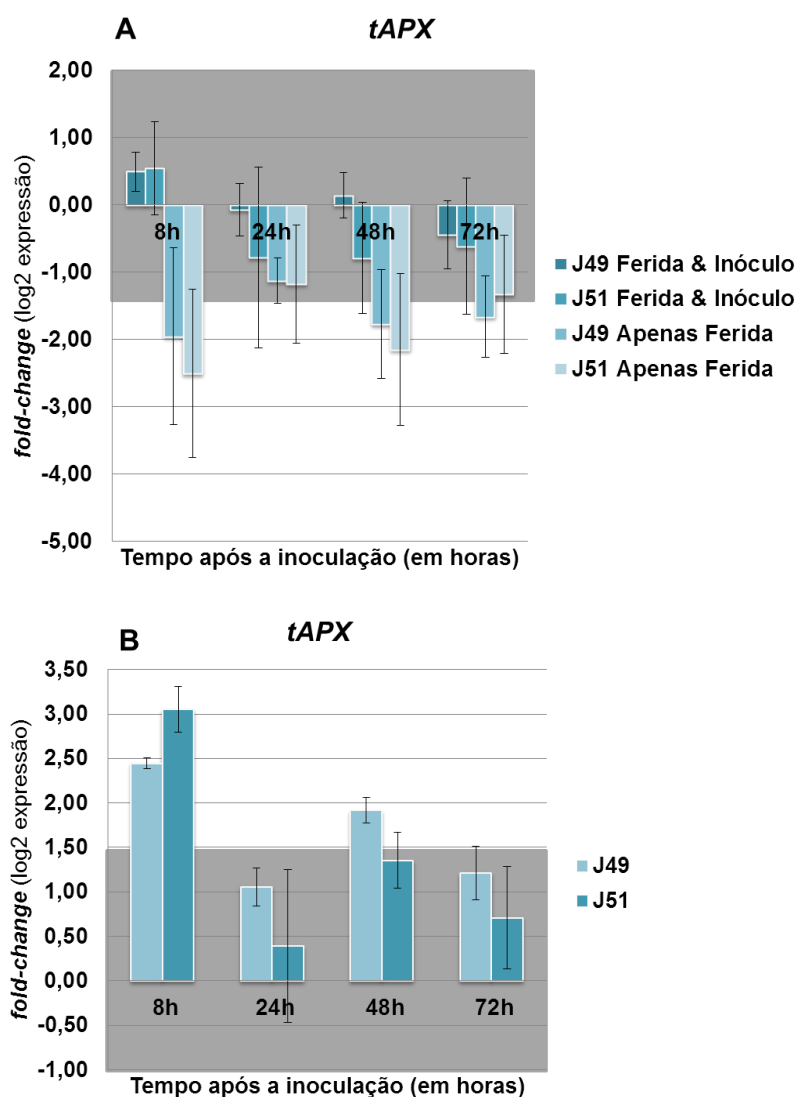


Figura 4.18 – Expressão relativa do gene *tAPX* em amostras de folhas de 2 acessos de *J. curcas*, recolhidas ao longo de 72 horas de incubação; A – Variação da expressão génica (*fold change*) em relação ao tempo inicial; B- Variação da expressão génica (*fold change*) em relação aos 2 tratamentos (Ferida & Inóculo e Apenas Ferida) no próprio tempo; a área assombreada corresponde a valores considerados não significativos.

Globalmente, os resultados da expressão dos diversos genes testados revelam que existe uma expressão diferenciada nos dois tipos de tratamento “Ferida & Inóculo” e “Apenas ferida”, em que, regra geral, a variação da expressão génica é superior no último tipo de tratamento. Com excepção das quitinases, a expressão génica dos 2 acessos segue um perfil semelhante, sem diferenças dramáticas entre si.

4.3. Rastreio de Resistência a diferentes fungos em folhas de *J. curcas*

Com o objectivo de perceber se a resistência ao *Colletotrichum gloeosporioides* manifestada por diferentes genótipos de *Jatropha curcas* (Ferreira-Pinto *et al.*, 2011) se deve a mecanismos gerais de resistência a fungos, ou a mecanismos específicos quanto a esta espécie, foi efectuado um rastreio de resistência a fungos de três outras espécies, em folhas destacadas. O aspecto das lesões medidas no rastreio à resistência das folhas destacadas de *J. curcas* após inoculações com os 3 fungos usados, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Stemphylium* sp., pode ser observado na Figura 4.19 onde se mostram representativamente os 3 diferentes graus de sintomas: resistência, resistência moderada e susceptibilidade. As lesões observadas envolvem a necrose dos tecidos da folha à volta do ponto de inoculação, precedida de um amarelecimento dos tecidos.

A contagem das lesões observadas nos 9 pontos de inoculação (3 pontos em 3 folhas) permitiu calcular a incidência da infecção em percentagem, registada na Tabela 4.7. A incidência da infecção foi baixa no caso da *A. alternata* cuja maioria das percentagens calculadas para cada acesso foi inferior a 50%. A incidência da infecção tanto em *B. cinerea* como em *Stemphylium* sp. foi elevada, chegando a 100% em 8 acessos inoculados com *B. cinerea* e 9 acessos inoculados com *Stemphylium* sp.

O diâmetro das lesões em resposta à inoculação com *A. alternata* mensurado foi o mais baixo com valores que variaram entre 0,0 e 0,6 cm. O diâmetro medido das lesões provocadas por inoculação de *Stemphylium* sp. variou de 0,0 a 0,8 cm enquanto que a inoculação de *B. cinerea* foi a que resultou em infecções mais severas, com diâmetro mensurado com variando de 0,1 a 2,0 cm. O desvio padrão calculado para o diâmetro da lesão foi, em muitos casos, elevado, o que significa que existe uma dispersão dos dados em torno da média

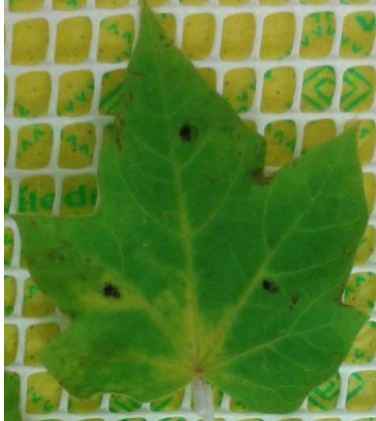

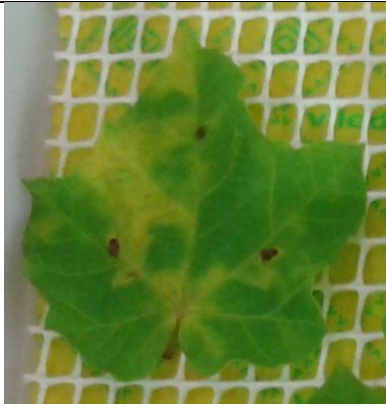



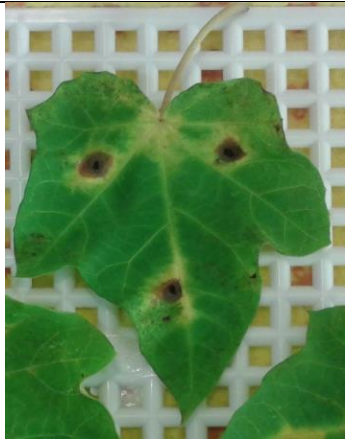

Fungo inoculado	Classificação quanto à tolerância		
	Resistente	Moderadamente resistente	Susceptível
<i>Alternaria alternata</i>			Não se verificou
	Acesso J61	Acesso J2	
<i>Botrytis cinerea</i>			
	Acesso J53	Acesso J51	Acesso J47
<i>Stemphylium sp.</i>			
	Acesso J78	Acesso J58	Acesso J51

Figura 4.19 – Exemplos do aspecto macroscópico de folhas destacadas de *J. curcas* apresentando as lesões resultantes da inoculação pelos fungos, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Stemphylium sp.*, ao fim de 7 dias de incubação a 22°C.

Tabela 4.7 - Percentagem de infecção (N=3x3) e o diâmetro (média ± desvio padrão) da lesão resultante da inoculação com os fungos usados (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Stemphylium sp.*) em folhas de 16 acessos de *J. curcas*, ao fim de 7 dias de incubação.

Acessos	Fungos usados					
	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Stemphylium sp.</i>	
	Infecção (%)	Diâmetro (cm)	Infecção (%)	Diâmetro (cm)	Infecção (%)	Diâmetro (cm)
J2	44,4	0,6 ± 0,3	100,0	0,2 ± 0,1	100,0	0,6 ± 0,3
J45	22,2	0,2 ± 0,1	100,0	1,4 ± 0,7	100,0	0,7 ± 0,3
J46	55,6	0,1 ± 0,1	100,0	1,5 ± 0,5	100,0	0,7 ± 0,2
J47	22,2	0,1 ± 0,0	100,0	1,2 ± 0,6	88,9	0,4 ± 0,2
J49	22,2	0,2 ± 0,0	66,7	1,3 ± 0,2	55,6	0,5 ± 0,3
J51	44,4	0,1 ± 0,1	33,3	0,7 ± 0,1	66,7	0,8 ± 0,2
J53	66,7	0,1 ± 0,1	77,8	0,4 ± 0,3	33,3	0,1 ± 0,1
J54	33,3	0,1 ± 0,1	100,0	0,9 ± 0,6	88,9	0,5 ± 0,2
J55	0,0	-	88,9	2,0 ± 0,4	100,0	0,8 ± 0,2
J58	44,4	0,2 ± 0,1	88,9	0,4 ± 0,2	66,7	0,3 ± 0,2
J61	11,1	0,4 ± 0,0	55,6	0,1 ± 0,0	100,0	0,3 ± 0,1
J64	44,4	0,3 ± 0,2	100,0	1,1 ± 0,2	100,0	0,7 ± 0,1
J67	44,4	0,2 ± 0,1	100,0	1,1 ± 0,5	100,0	0,8 ± 0,3
J71	11,1	0,1 ± 0,0	100,0	0,8 ± 0,6	100,0	0,3 ± 0,1
J73	22,2	0,2 ± 0,1	88,9	1,0 ± 1,1	100,0	0,6 ± 0,2
J78	0,0	-	88,9	0,9 ± 0,5	0,0	-

Relacionando os parâmetros da incidência da infecção e o tamanho da infecção, obteve-se a severidade da doença.

Os rastreios de resistência em folhas destacadas de *J. curcas* para os 3 fungos filamentosos *Stemphylium sp.*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata* produziram resultados muito distintos quanto a este parâmetro. O fungo *B. cinerea* originou os resultados mais severos, pelas maiores dimensões de lesão e maiores percentagens de infecção; e em que *A. alternata* apresentou os resultados menos severos, ou seja, menores dimensões de lesão como menores percentagens de infecção. Considerando-se, assim, *B. cinerea* a espécie fúngica testada mais virulenta e *A. alternata* a menos agressiva. As taxas de infecção mostram que, em geral, baixas percentagens de infecção resultam em dimensões lesivas com valores mais baixos.

O ensaio com *A. alternata* (Figura 4.20) revela que a maioria dos acessos testados são resistente a este fungo, classificando-se 15 genótipos como resistentes e 1 como moderadamente resistente. O diâmetro máximo medido foi de 0,6 ± 0,3 cm e foi observado no acesso J2. Os acessos J55 e J78 não registaram qualquer lesão em resposta à infecção.

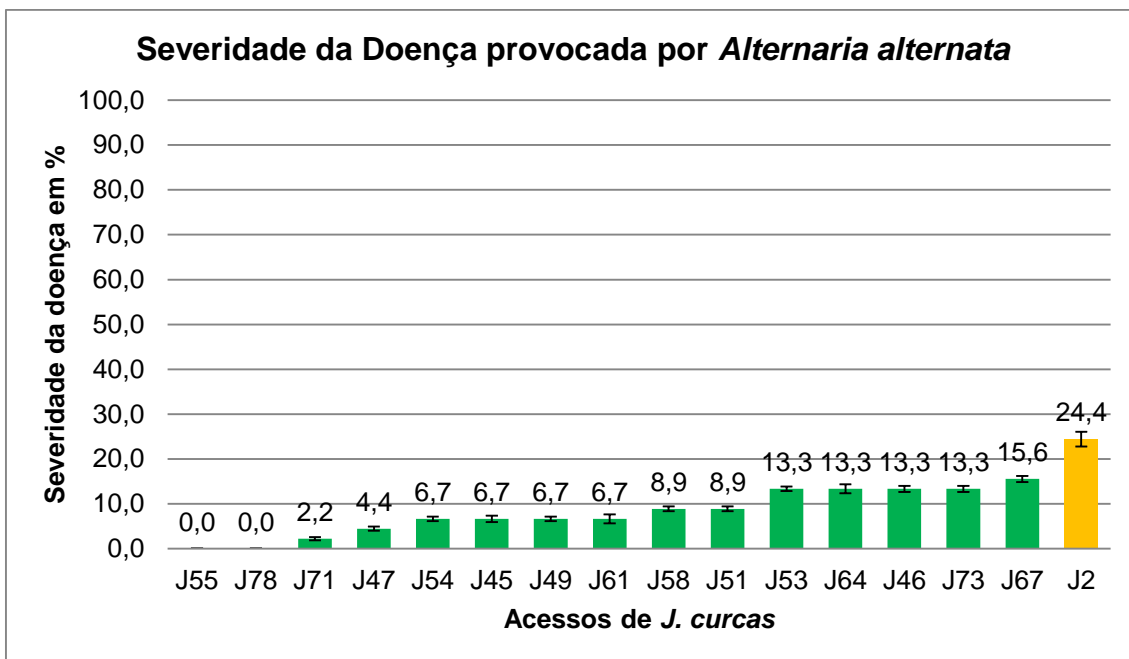


Figura 4.20 – Severidade da Doença, em percentagem, resultante da inoculação com *Alternaria alternata* em folhas de 16 acessos de *J. curcas*, ao fim de 7 dias de incubação. Coloridos a verde, os resistentes e a amarelo, os moderadamente resistentes (N=3x3).

O ensaio com *B. cinerea* (Figura 4.21) mostrou que a maior parte dos genótipos testados foi susceptível a este fungo, totalizando 13 acessos assim classificados e apenas 1 acesso mostrou ser resistente. Apesar das dimensões lesivas terem variado significativamente ($P < 0,001$), foi o fungo *B. cinerea* que provocou os maiores diâmetros lesivos nas folhas com o valor máximo registado de $2,0 \pm 0,4$ cm para o acesso J55 e 8 acessos registaram valores lesivos iguais ou superiores a 1,0 cm. A menor lesão provocada por *B. cinerea* foi registada no acesso J61 com um valor de $0,1 \pm 0,0$ cm. O número de acessos susceptível é o mesmo observado no rastreio ao *Stemphylium* sp., mas os valores de severidade são superiores, isto porque as percentagens de infecção nos 2 fungos são altas, quase sempre em torno dos 100%, porém as dimensões das lesões medidas em *B. cinerea* são muito maiores.

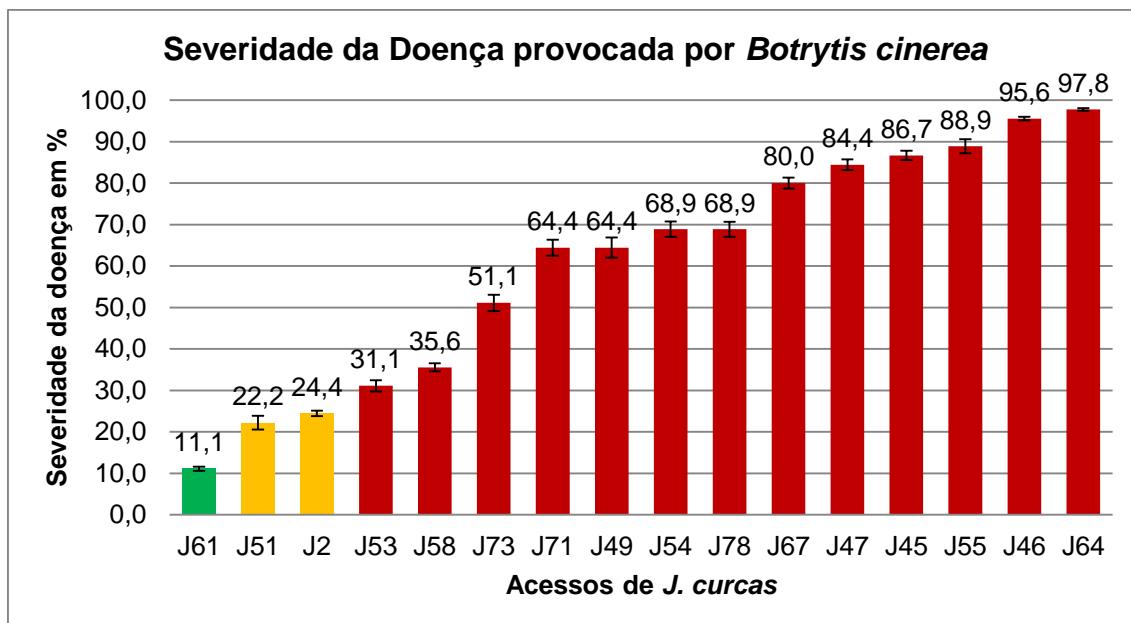


Figura 4.21 – Severidade da Doença, em percentagem, resultante da inoculação com *Botrytis cinerea* em folhas de 16 acessos de *J. curcas*, ao fim de 7 dias de incubação. Coloridos a verde, os resistentes; a amarelo, os moderadamente resistentes e a vermelho, os susceptíveis (N=3x3).

O ensaio com *Stemphylium* sp. (Figura 4.22) resultou na verificação de um grande número de acessos classificados com susceptíveis, totalizando 13 acessos. Apesar dos diâmetros das lesões serem menores do que em *B. cinerea*, regista-se uma variação significativamente diferente na dimensão das lesões ($P < 0,001$): o valor mais alto para o diâmetro da lesão foi $\approx 0,8 \pm 0,3$ cm, para o acesso J67, e o valor mais baixo foi $0,1 \pm 0,1$ cm para o acesso J53, já o acesso J78 não sofreu qualquer dano resultante da inoculação com este fungo.

A classificação de todos os acessos rastreados a cada fungo está reunida na Tabela 4.8, e inclui os resultados obtidos quanto a tolerância ao *Colletotrichum* previamente reportados por Ferreira-Pinto e colaboradores (2011). Nenhum acesso de *J. curcas* foi classificado como resistente nem susceptível a todos os fungos usados nos rastreios. Estes resultados sugerem que a resistência à antracnose não decorre de um mecanismo geral de resistência a fungos, mas dependente da espécie específica de fungo em questão.

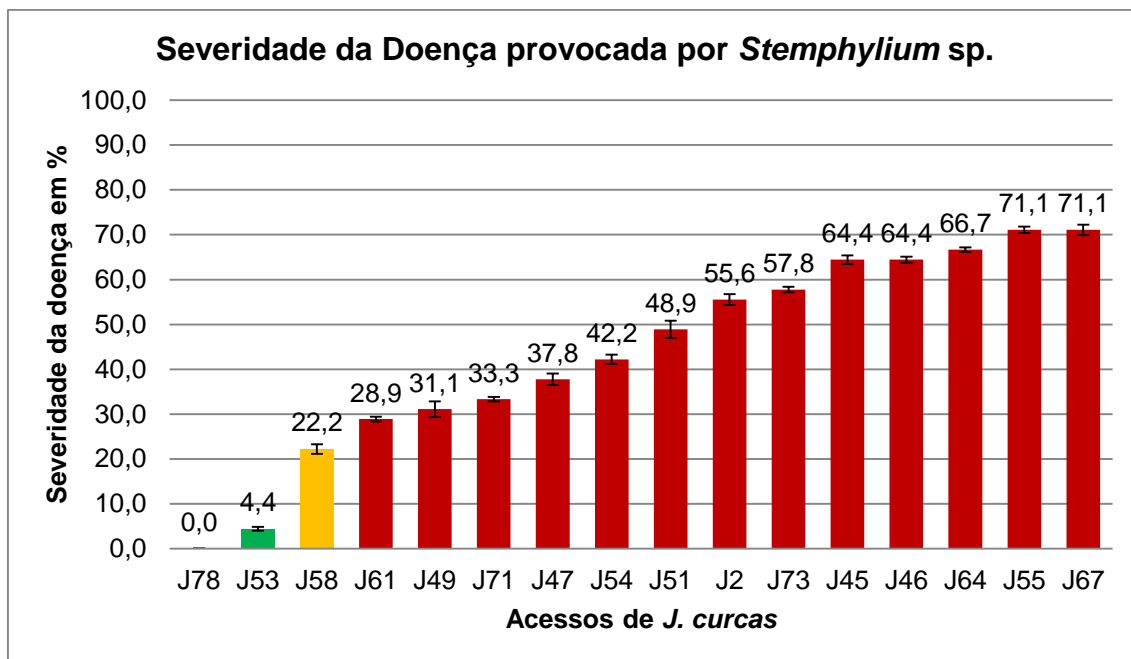


Figura 4.22 – Severidade da Doença, em percentagem, resultante da inoculação com *Stemphylium* sp. em folhas de 16 acessos de *J. curcas*, ao fim de 7 dias de incubação. Coloridos a verde, os resistentes; a amarelo, os moderadamente resistentes e a vermelho, os susceptíveis (N=3x3).

Tabela 4.8 – Resumo da classificação de cada acesso de *J. curcas* testado quanto ao tipo de tolerância para os 4 fungos usados, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Stemphylium* sp. e *Colletotrichum gloeosporioides*. R – resistente, MR – moderadamente resistente e S – susceptível. *Ferreira-Pinto et al., 2011.

Acesso	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>Stemphylium</i> sp.	<i>C. gloeosporioides</i> *
J2	MR	MR	S	R
J45	R	S	S	MR
J46	R	S	S	S
J47	R	S	S	S
J49	R	S	S	R
J51	R	MR	S	S
J53	R	S	R	MR
J54	R	S	S	R
J55	R	S	S	R
J58	R	S	MR	MR
J61	R	R	S	S
J64	R	S	S	MR
J67	R	S	S	S
J71	R	S	S	R
J73	R	S	S	R
J78	R	S	R	S

A dimensão das lesões resultantes da inoculação por cada fungo foi alvo de uma posterior Análise de Componentes Principais (PCA), cujos resultados são mostrados na Figura 4.23.

A componente principal 1 (PC1) separa os acessos de acordo com a tolerância a *B. cinerea*. Do lado direito (valores positivos do eixo das abscissas) encontram-se os acessos J2 e J61, ambos resistentes à infecção por *Botrytis*. Do esquerdo (valores negativos do eixo das abscissas) encontram-se os acessos susceptíveis a *B. cinerea* que inclui a maioria dos acessos de *J. curcas* rastreados. Este resultado está de acordo com o verificado quanto à importância da severidade da infecção deste fungo.

A componente principal 2 (PC2) divide de acordo com a tolerância a *C. gloeosporioides*. Os valores positivos do eixo das ordenadas incluem os acessos resistentes ao *C. gloeosporioides*, isto é, os acessos com menores dimensões da lesão. Já os valores negativos incluem os acessos classificados como susceptíveis a este fungo.

Os dados tratados por PCA permitiram a divisão dos acessos de *J. curcas* em 5 grupos com comportamentos semelhantes na resposta à infecção por cada um dos 4 fungos utilizados. No entanto, observa-se que 3 dos 5 grupos são constituídos apenas por um só acesso de *J. curcas*; o que significa que 3 acessos apresentam um comportamento ímpar que os distingue dos restantes.

O grupo I, ou seja, o acesso J61 caracteriza-se pela reduzida dimensão da mancha foliar provocada por 3 fungos, *A. alternata*, *B. cinerea* e *Stemphylium* sp. e uma lesão necrótica de maiores dimensões em relação ao *C. gloeosporioides*.

O grupo II, ou seja, o acesso J51 caracteriza-se por dimensões elevadas da mancha foliar causada por *C. gloeosporioides* e por dimensões médias a rondar os 0,7 e 0,8 cm para os fungos *B. cinerea* e *Stemphylium* sp., respectivamente, e pela reduzida mancha provocada por *A. alternata*.

O grupo III que inclui os acessos J46 J47, J53, J58, J78 e J67 caracteriza-se pela susceptibilidade ao *C. gloeosporioides*. Observa-se ainda que os pares J53/J58 e J46/47 tiveram um comportamento muito idêntico.

Deste modo, os grupos I, II e III têm em comum a susceptibilidade à antracnose (e a resistência à *A. alternata*).

O grupo IV que inclui J45, J49, J54, J55, J64, J71 e J73 caracteriza-se sobretudo pelas baixas dimensões da lesão necrótica causada por *C. gloeosporioides*, ou seja, pela resistência à antracnose.

O grupo V, ou seja, o acesso J2 distingue-se sobretudo pelo maior valor da dimensão da lesão causada por *A. alternata*, em contra-ciclo com todos os outros acessos, sendo resistente ou moderadamente resistente aos restantes fungos.

Estes grupos não coincidem com a sua região de origem ou proveniência (Tabela 3.1).

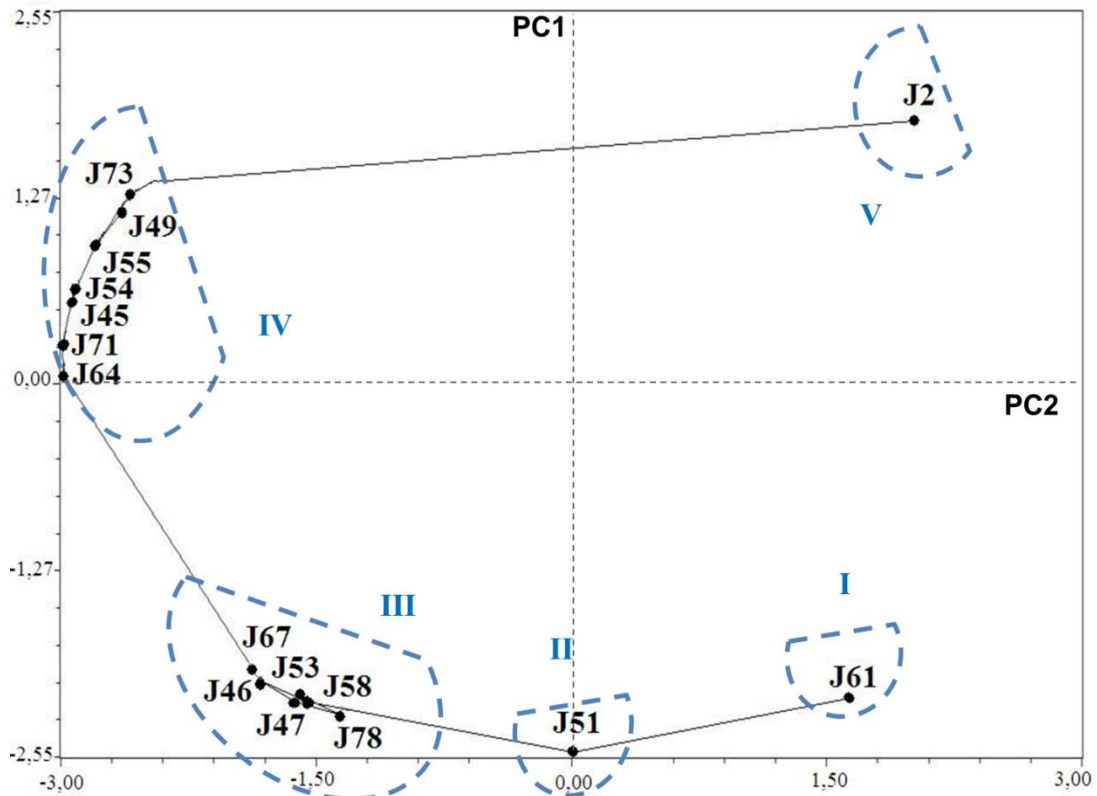


Figura 4.23 – Análise de componentes principais (PCA) com os dados das lesões provocadas por todos os fungos usados a todos os acessos de *J. curcas* testados. As primeira e segunda componentes principais explicam 56.6% e 41.5% da variação total, respectivamente.

5. Discussão

Têm sido publicados muitos trabalhos de rastreio à antracnose (por diferentes espécies de *Colletotrichum*) a diversos tipos de plantas (Tabela 5.1), o que indica que a necessidade de encontrar acessos resistentes à antracnose é bastante reconhecida.

A conclusão de que os mecanismos de defesa usados pela planta contra à antracnose não são gerais para diferentes fungos, e sim específicos para resposta a *C. gloeosporioides* levou a uma escolha e adaptação de metodologias experimentais e de análise. O rastreio efectuado anteriormente, por Ferreira-Pinto e colaboradores (2011) no Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT) a 38 acessos de *J. curcas* à resistência à antracnose (*C. gloeosporioides*) e no qual foi classificados 9 acessos como resistentes, 6 como moderadamente resistentes e 23 como susceptíveis serviu de base de escolha de material vegetal para o rastreio a 3 espécies fungos adicionais, usando a mesma metodologia. Para este ensaio foram seleccionados um número igual de acessos avaliados como resistentes e susceptíveis à antracnose, 6 para cada tipo de tolerância e 4 moderadamente resistentes.

Tal como Ferreira-Pinto e colaboradores (2011) e verificado neste trabalho, os dados obtidos em resultado de diversos métodos de inoculação testados indicaram que a inoculação com ferida (picada de uma seringa) e o uso de disco de micélio provocavam as maiores taxas de infecção e as maiores lesões, mostrando ser um método mais apropriado para ensaios do que na ausência de ferida.

A evidência de que danos físicos em tecidos vegetais vivos tornam-os mais vulneráveis à invasão por fungos patogénicos foi também verificada por diversos autores. Chassot e colaboradores (2008) relatam que os ferimentos de tecidos foliares facilita a infecção por fungos necrotróficos porque fornece nutrientes e cria áreas necróticas que facilitam a penetração do patogénico nos tecidos vegetais e acrescentam que ferimentos de agulhas são frequentemente usados na inoculação de fungos necrotróficos em folhas e frutos em ensaios laboratoriais controlados. No entanto, estes mesmos autores relatam que ferimentos em folhas de *Arabidopsis thaliana* inibem o crescimento de hifas de *Botrytis cinerea*, chamando a este processo de resistência induzida por ferimento. Já Calo e colaboradores (2006) relatam que usaram os ferimentos por agulha em folhas de *Arabidopsis thaliana* para os ensaios de inoculação com *Botrytis cinerea* com o objectivo de induzir o início da infecção. Fail e Langenheim (1990) relatam que ferimentos nas folhas de *Hymenaea courbaril* provocaram um rápido crescimento de hifas de *Pestalotia subcuticularis* e acrescentam que o ferimento reduz a fase de latência do fungo. Também Mafia e colaboradores (2009) relatam que os ferimentos reduzem o período de latência e facilitam a penetração do fungo *Quambalaria eucalypti* em *Eucalyptus* spp. García-Guzma e Dirzo (2001) propõem que o mecanismo predominante para o estabelecimento fúngico são ferimentos, tais como aqueles provocados por herbívoros e só raramente a infecção ocorre através de contacto directo sem feridas em ensaios de patogenicidade de diversas plantas da floresta tropical mexicana. Também López e Lucas (2010) relatam que os danos mecânicos das folhas aumentaram a susceptibilidade nas folhas dos clones de cajueiro a todos os isolados de *C. gloeosporioides* (López e Lucas, 2010).

O uso de folhas destacadas como material vegetal seleccionado para fazer os rastreios de resistência justifica-se por um lado porque são as folhas os órgãos mais infectados pela antracnose, sujeitas à conseqüente necrose dos seus tecidos, afectando os rendimentos da planta por diminuição da sua capacidade fotossintética (Obilo *et al.*, 2010), e por outro lado, porque esta estratégia permite poupar tempo, espaço, custos, aumentar o número de réplicas e melhorar o controlo das condições ambientais tais como temperatura, humidade e luz, contrastando com a aplicação limitada de testes em plantas inteiras que implicam estudos em campo que podem chegar a ser restritos a quarentena (Kunkeaw *et al.*, 2010). Os resultados obtidos devem ser considerados como uma primeira indicação do potencial de resistência dos génotipos testados. Por exemplo, de acordo com Buchwaldt e colaboradores (2004) foi necessário um período superior a 5 anos para completar um rastreio completo à antracnose (*C. truncatum*) no campo usando 1771 acessos de lentilhas e, de acordo com Fokunang e colaboradores (2001), não se verifica uma adequada correlação entre os dados obtidos *in vitro*, em condições de estufa com aqueles obtidos em condições de campo na avaliação de resistência ao *Colletotrichum gloeosporioides* em mandioca.

A adaptação da fórmula da *Severidade de Doença* em percentagem (Tivoli *et al.*, 2006), definida como a quantidade de doença por unidade de amostra (Nutter *et al.*, 2006), usada para avaliação dos sintomas permitiu relacionar os 2 parâmetros medidos: a percentagem de infecção e o diâmetro da lesão. A percentagem de infecção também pode ser designada como a *Incidência da Doença* (ver tabela 4.1.2), definida como unidades de amostra afectadas pela doença (que expressam sintomas) divididas pelo número total de unidades amostradas (Nutter *et al.*, 2006). Neste caso, existem 9 pontos de inoculação que representam o número máximo de amostragem.

A medição do diâmetro da lesão provocada pelo fungo e a contagem do número de infecções são métodos paramétricos, e foram usados neste trabalho, para tornar mais objectiva a avaliação dos sintomas. Os métodos paramétricos envolvem a medição concreta do tamanho de lesões ou contagem do número de lesões (Tivoli *et al.*, 2006). Este método foi utilizado em outros trabalhos como por exemplo, no rastreio à resistência ao *C. gloeosporioides* de cultivares de mandioca (*Manihot*), no qual Fokunang e colaboradores (2002) misturaram o meio de PDA com extractos da mandioca e mediram o número e diâmetro das colónias.

No entanto, certos autores optaram por métodos não paramétricos para a avaliação dos sintomas que normalmente baseiam-se em escalas de pontuação para a intensidade dos sintomas (Tivoli *et al.*, 2006). Por exemplo, Tolu e colaboradores (2006) examinaram acessos de espécies selvagens pertencentes ao género *Lens* para a resistência a 2 estripes de *Colletotrichum truncatum*, cuja avaliação dos sintomas era visual com uma escala de 1 a 9. Já Galván e colaboradores (1997), num rastreio à resistência ao *C. gloeosporioides* em acessos de cebola (*Allium sp.*), usaram uma escala qualitativa ordinal de 0 a 3 em que cada grau representa uma percentagem aproximada de área foliar afectada. Kumar e colaboradores (2013), num rastreio à resistência à *A. alternata* em folhas de pimento (*Capsicum annuum*), usaram uma escala de 0 a 5 em que cada grau também representa uma percentagem

aproximada de área foliar afectada. Uma abordagem com uma escala similar também foi usada por Furlan e colaboradores (2010) num rastreio ao *C. gloeosporioides* em folhas de acessos de macieira (*Malus domestica*).

Por outro lado, métodos que se baseiam na estimativa da percentagem de área afectadas são considerados subjectivos (Tivoli *et al.*, 2006). Por isso, Nutter e colaboradores (2006) abordam conceitos *fitopatométricos* que surgiram a partir de estimativas da severidade da doença (normalmente área foliar doente) que vêm reiteradamente acompanhadas com algumas falhas na precisão e exatidão.

Na bibliografia consultada (tabela 5.1) foram encontradas diversas possibilidades de se fazer rastreios em folhas de plantas afectadas por fitopatologias causadas por fungos que variam significativamente, tanto a nível de metodologia (sobretudo com o método de inoculação) como com a avaliação dos sintomas. Tivoli e colaboradores (2006) constataam que há uma falta de uniformidade entre este tipo de ensaios. Contudo, nota-se a procura de procedimentos mais simples e fáceis de usar.

O diferente grau de severidade da infecção de folhas de *Jatropha* de acordo com a espécie de fungo inoculada é confirmada por trabalhos anteriormente publicados. As condições experimentais empregues durante a inoculação e incubação das folhas infectadas mostraram ser propícias para o desenvolvimento do fungo. Manjunath e colaboradores (2011) referem que a temperatura de 25° C e que os ciclos de 12 horas de luz alternados são algumas das condições mais favoráveis para o crescimento *C. gloeosporioides*. De fato, *C. gloeosporioides* ataca geralmente o hospedeiro (a mandioca) mais frequentemente durante as estações da chuva em que as temperaturas variam entre 20 a 27° C e a humidade relativa é alta (89 a 98%) como resultado as novas folhas que brotam durante esta estação ficam mais propensas à infecção com o patogénico (Fokunang *et al.*, 1999).

Os danos poucos severos provocados por *A. alternata* confirmam os resultados de Usha e Rekha (2012), que reportam que o fungo normalmente não provoca danos graves nesta espécie. No entanto, em plantas de outras espécies, como o pimento (*Capsium annuum*), este é o fungo que mais danos causa (Kumar *et al.*, 2013). Mesmo assim, no rastreio realizado pelos mesmos autores (ver Tabela 5.1) uma grande proporção de cultivares resistentes ou moderadamente resistentes, 35 num total de 82, foi encontrada.

O fungo *A. alternata* é frequentemente encontrado em folhas de *J. curcas* (ver Introdução, secção 2.3). Pelo contrário, a bibliografia consultada não associa os fungos *Stemphylium* sp. e *B. cinerea* com aspectos de fitopatologia de *J. curcas*. Estes dados sugerem que a interacção entre hospedeiro e patogénico é importante para a planta criar mecanismos de defesa (Tivoli *et al.*, 2006).

Tabela 5.1 – Informação recolhida na bibliografia referente a rastreios de resistência recolhida. R- Resistentes, MR - Moderadamente Resistentes, MS - Moderadamente Susceptíveis, S - Susceptíveis, HS - Altamente Susceptíveis

Material vegetal	Fungo usado	Resumo	Autores
Caules e folhas de 45 clones de mandioca (<i>Manihotis esculenta</i>) + 24 clones de inhame (<i>Dioscorea</i> sp.)	Metabolitos tóxicos de <i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>manihotis</i>	Os metabolitos fitotóxicos do fungo provocaram lesões necróticas típicas. Mandioca: 17 R, 11 MR, 17 S. Inhame: 6R, 11MR, 7S.	Amusa, 2000
Folhas destacadas de 5 genótipos de fava (<i>Vicia faba</i>)	<i>Botrytis fabae</i>	Mediram componentes de resistência parcial: período de incubação, número de manchas, diâmetro da lesão, período de latência e número de esporos/folheto	Bouhassan <i>et al.</i> , 2003
10 Acessos de mandioca (<i>Manihotis esculenta</i>)	<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>manihotis</i>	<i>In vitro</i> : mistura de meio de PDA e extracto do caule e medição do crescimento micelial. Avaliação em campo em 2 temporadas de cultivo confirma resultados <i>in vitro</i> .	Fokunang <i>et al.</i> , 2002
245 Acessos de macieira (<i>Malus domestica</i>)	<i>C. gloeosporioides</i> (3 isolados)	76,3%R e 23,7%S	Furlan <i>et al.</i> , 2010
>30 Acessos selvagens do género da cebola (<i>Allium</i> sp.)	<i>C. gloeosporioides</i> (3 isolados: Brasil, Nigéria e Indonésia)	Isolado indonésio provoca maior severidade. Maior resistência observada em <i>A. galanthum</i> e <i>A. Fistulosum</i>	Galván <i>et al.</i> , 1997
82 Culturas de pimento (<i>Capsium annum</i>)	<i>Alternaria alternata</i>	16 R, 19MR, 11 MS, 26S, 10 HS	Kumar <i>et al.</i> , 2013
Folhas destacadas de 15 cultivares de feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>Botrytis cinerea</i>	O objectivo era um rápido procedimento de rastreio. Ao inóculo foi adicionado diferentes concentrações de fosfato inorgânico e glucose para os esporos serem estimulados. Também verificaram que a humidade do ar elevada aumentava a infecção.	Leone & Tonneijck, 1990
4 Clones comerciais + 1 não comercial de Cajueiro-anão (<i>Anacardium occidentale</i>)	<i>C. gloeosporioides</i> (36 isolados)	Verificaram que a lesão mecânica das folhas aumenta a susceptibilidade a todos os isolados.	López & Lucas, 2010
20 Acessos de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) provenientes do Uganda	<i>C. sublineolum</i>	Estudo conduzido em campo durante 2 anos. Um acesso altamente resistente à antracnose também apresentava menor severidade ao bolor nos grãos.	Prom <i>et al.</i> , 2011
31 Cultivares de milhete (<i>Pennisetum glaucum</i>)	<i>Sclerospora graminicola</i>	Uma proteína do patogénio apresenta uma especificidade de ligação diferenciada às células vegetais susceptíveis em suspensão. Foi empregue o método ELISA para quantificar a proteína. Correlação positiva com rastreio de resistência em campo.	Shishupala <i>et al.</i> , 1996
574 Acessos de 6 espécies selvagens do género da lentilha (<i>Lens</i> sp.)	<i>C. truncatum</i> (2 estripes)	Acessos com maior frequência de resistência provêm da Síria e Turquia	Tollu <i>et al.</i> , 2006

Os resultados de infecção muito severa obtidos após inoculação de *B. cinerea* estão de acordo com observações anteriores reportadas na bibliografia, que refere estes fungos como sendo dos mais patogénicos em plantas (Dean *et al.*, 2002). Num rastreio a *B. cinerea* (Tabela 5.1), feito por Leone & Tonneijck (1990), em 15 cultivares de feijoeiro, obtiveram percentagens de infecção que variaram entre 3,3% a 48,3%, após infecções sem fermento e um método de inoculação diferente, o que pode contribuir para os valores de infecção mais baixos observados.

No estudo de antracnose (*C. truncatum*) em lentilha (*Lens culinarius*) realizado por Chongo & Bernier (2000), é sugerido que diferentes genótipos actuando como hospedeiro afectam significativamente a incidência da doença, o tamanho da lesão e esporulação. Entre cultivares classificadas como susceptíveis, a incidência foi de 100% mas esta variou entre 33 a 100% naquelas que eram classificadas como resistentes. O facto da incidência da doença chegar aos 100% em cultivares considerados resistentes significa que estes autores deram mais ênfase ao tamanho da lesão na classificação dos sintomas.

Importa ressaltar que nenhum acesso foi totalmente resistente nem susceptível a todos os fungos simultaneamente. Tal significa que a eleição de um acesso de *J. curcas* mais apropriado para a agricultura ou para programas de cruzamento tem de ter algum grau de compromisso entre a intensidade e frequência de possíveis danos que cada fungo pode provocar, tornando a resistência à antracnose prioritária, pois, entre os fungos testados, *C. gloeosporioides* é que frequentemente provoca infecções graves em *J. curcas*.

Costa e colaboradores (2010) após seleccionarem 1 linha de sementes de feijão preto (*Phaseolus vulgaris*) resistente à antracnose e a mais outras 2 doenças típicas desta planta, fizeram retrocruzamentos com outra linha com outros traços desejáveis (i.e., rendimento). Novos rastreios não só à resistência aos 3 fungos como também ao rendimento foram realizados às novas sementes obtidas, de forma a lançar novas variedades de feijão preto resistentes.

Mehta e colaboradores (2005), a partir de 11 acessos de sorgo (*Sorghum bicolor*) resistentes à antracnose (*C. graminicola*), fizeram cruzamentos entre resistentes x resistentes (e novos rastreios), de forma a identificar se diferentes fontes de resistência à antracnose possuem diferentes genes para a resistência. Com base nos 2 trabalhos anteriores, a investigação em *J. curcas* pode prosseguir com o cruzamento entre os acessos avaliados como resistentes e a quantificação do rendimento das sementes e sua composição.

Nos resultados de rastreio à tolerância à antracnose, o acesso J49 foi o que registou as menores lesões e J51 as maiores lesões. Assim, este material contrastante foi seleccionado para os ensaios de acompanhamento da infecção por microscopia e de expressão génica, como modelos paradigmáticos de extremos de tolerância à antracnose.

O uso de dois tipos de microscopia para acompanhar a progressão da antracnose em folhas de *J. curcas* permitiu observar a zona de infecção à superfície da folha e observar a zona de infecção numa perspectiva complementar tal como visualizar o aspecto interior dos esporos e

observações distintas do. aspecto dos apressórios. A microscopia óptica revelou ainda ser um instrumento útil na recolha de dados microscópicos sobre o processo infeccioso, pois permitiu a recolha mais rápida de informações preliminares, auxiliando na orientação nas observações microscópicas mais elaboradas, como é o caso da microscopia electrónica.

Como o intuito foi recolher dados da infecção observáveis à superfície da folha, o trabalho focou-se sobretudo na examinação dos estágios germinativo, pré-penetração e penetração do processo infeccioso do fungo *C. gloeosporioides*. Dessa forma, optou-se pela recolha de amostras até 5 dias, ou seja, 120 horas, após inoculação para análise microscópica. De referir que ainda que observações microscópicas ópticas preliminares (dados não mostrados), indicarem que a taxa de germinação nas primeiras 48 h após inoculação seria baixa e, por isso, optou-se por não recolher amostras em períodos inferiores às 24 horas após a inoculação para visualização por microscópica electrónica.

Os resultados obtidos mostraram que as diferenças biológicas identificadas entre os 2 acessos de *J. curcas* estão relacionadas com a maturação dos esporos do fungo, ou seja, nas percentagens de septação e germinação dos esporos. A resistência contrastante à antracnose entre os 2 acessos não se deveu a diferenças na penetração do fungo. As diferenças encontradas na maturação dos esporos do fungo entre os 2 acessos de *J. curcas* sugerem que moléculas do hospedeiro afectem o desenvolvimento precoce dos esporos do fungo.

Do ponto de vista metodológico, o aumento da susceptibilidade à infecção observado após dano mecânico (ferida com uma agulha) provocado nas folhas de *J. curcas* durante os ensaios de rastreio e que se escolheu nos ensaios para observação microscópica para não alterar as condições de inoculação são corroborados pela evidência de que danos mecânicos das folhas aumentaram a susceptibilidade nas folhas dos clones de cajueiro a todos os isolados de *C. gloeosporioides*, indicando que a resistência pode estar associada a barreiras estruturais que impedem a penetração (López e Lucas, 2010).

No entanto, quanto ao método de inóculo, para os ensaios de microscopia, usou-se uma suspensão de esporos, em vez de discos de micélio, para evitar a contaminação das amostras com hifas pré-existentes do próprio micélio, assegurando que as hifas observadas resultariam da germinação dos esporos. O inóculo preparado através de uma suspensão de esporos com uma concentração de aproximadamente 5×10^7 conídios/mL foi baseado nos protocolos de microscopia, nomeadamente em 1×10^8 (Babu *et al.*, 2011) e $2,5 \times 10^6$ conídios/mL (Alberto *et al.*, 2002) porque estes protocolos eram os mais adequados ao nível de material vegetal, fúngico e ao tipo de microscopia para os objectivos que se pretendia. Contudo, outros autores usam concentrações diversas como 1×10^6 (Kumar *et al.*, 2001), $3,5 \times 10^6$ (Fokunang *et al.*, 2001), 1×10^5 (Fernando *et al.*, 2001), 1×10^4 conídios/mL (Dalisay & Kuc, 1995). A elevada concentração resultou numa ubíqua sobreposição e emaranhado de esporos e hifas que dificultou o discernimento do percurso e ramificação de hifas individuais. Deste modo, seria recomendável usar uma concentração de esporos mais baixa nestes ensaios de modo a obter uma densidade menor de esporos e hifas na folha.

Segundo Morin e colaboradores (1996), a capacidade dos conídios germinarem decresce significativamente à medida que a densidade do inóculo aumenta e que a densidade de 1×10^5 conídios/mL atinge o nível máximo de germinação (95-99%). Fernando e colaboradores (2000) também chegaram a uma conclusão semelhante para o *C. acutatum*, em folhas de *Hevea brasiliensis*, tendo verificado que a germinação era máxima entre 5×10^4 a 1×10^5 e que a auto-inibição numa concentração $\geq 8 \times 10^6$ chega a ser 100% mas não referem quantas horas após a inoculação. Com a concentração de esporos usada é preciso ter em conta de que os esporos podem estar sujeitos a um processo de auto-inibição da germinação.

As diferentes concentrações usadas pelos diferentes investigadores também dificulta a comparação de resultados.

Não foi possível determinar o momento exacto de quando os primeiros conídios começavam a germinar, mas às 24 horas após inoculação, a primeira observação, já se encontravam tubos germinativos formados em ambos os genótipos. Kumar e colaboradores (2001) relatam que a germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* em folhas de amoreira inicia-se tão cedo quanto 3 horas após a inoculação. Alberto e colaboradores (2002) relatam que os conídios em folhas da cebola germinam a partir de 6 horas após a inoculação. Babu e colaboradores (2011) relatam que os conídios em folhas de rícino germinam a partir de 9 horas após a inoculação. Na tabela 5.2. estão listados resultados publicados por outros autores como o início da germinação, formação de apressórios, o modo de penetração, o número de tubos germinativos e a dimensão dos conídios e dos apressórios de espécies de *Colletotrichum*

A presença de diferentes estados de maturação é revelada não só com o aumento da taxa de germinação dos esporos mas também com o aumento do número de esporos septados (Figura 4.7). Existe a formação de um septo antes da germinação dos conídios (Baley *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 2009). Assim, a germinação e a formação de septos nos esporos são acontecimentos relacionados.

A germinação dos esporos nas primeiras 24 ou 48 horas após a inoculação, pode estar dependente do estágio de maturação em que o esporo foi recolhido da caixa de Petri para preparar a suspensão de esporos, sendo que, na caixa, do centro para a periferia os esporos são cada vez mais jovens. E, este facto, pode explicar a pequena diferença observada na proporção de esporos septados e asseptados nas primeiras 24 horas após a inoculação entre os acessos J49 e J51 (Figura 4.7), pois a suspensão foi preparada em momentos diferentes, embora com a mesma concentração. No entanto, fica claro que as primeiras 24 horas após a inoculação os esporos encontram-se maioritariamente asseptados, isto é, em um estágio de maturação mais precoce.

A cor acastanhada escura dos apressórios maduros observada na microscopia óptica (ver Figura 4.2.8 A) deve-se à melanina. A melanização dos apressórios pode servir para proteger de radiação e suportar a pressão hidrostática interna da parede apressorial, servindo como uma barreira semi-impermeável, sendo essencial para a penetração de tecidos intactos (Baley *et al.*, 1992; Yong *et al.*, 2013).

Não foram observados tubos germinativos a entrar pelos estomas, mesmo nos casos em que passavam por ou encontravam aberturas estomáticas ou quando os conídios estavam na proximidade de estomas (Figura 4.9). Esta situação contrasta com aquela que foi observada nas folhas de amoreira em que os tubos germinativos e as suas ramificações laterais cresciam em direcção a estomas abertos (Kumar *et al.*, 2001). A maioria dos autores consultados (Tabela 5.2) relata que o fungo penetra directamente pela cutícula.

Segundo Munat e Maraite (1998), as taxas e o tipo de germinação conidial, tal como a formação de apressórios, são sobretudo controladas pelo próprio fungo. Assim, os estágios mais precoces de infecção são controlados geneticamente pelo próprio fungo. O momento de germinação e a morfologia de estruturas de pré-penetração foram semelhantes na superfície da folha das cinco espécies hospedeiras examinadas por Morin e colaboradores (1996). A penetração (nos tecidos/células) e o processo de infecção são independentes e são mecanismos especializados que variam com a interacção hospedeiro-patogénico (Kumar *et al.*, 2001). As plantas de mandioca mais jovens são mais susceptíveis à antracnose (Fokunang *et al.*, 1999).

Amusa (2000) fez rastreios de resistência em folhas e caules de diversos cultivares de mandioca (uma euforbiácea) para a antracnose usando, em vez de inóculo, um filtrado concentrado com os metabolitos de *C. gloeosporioides* obtendo lesões necróticas típicas deste fungo. Assim, os metabolitos fitotóxicos do patogénico podem afectar directamente os tecidos vegetais.

A patogenicidade e a produção de conídios de isolados fúngicos diferem consoante a parte da planta de onde provêm. No caso da planta da borracha, folhas velhas necróticas são a fonte de inóculo mais patogénica, ainda que produzam poucos conídios (Guyot *et al.*, 2005).

Chongo e colaboradores (2002) observaram que os *pegs* de infecção e tubos germinativos penetravam em apressórios e conídios (*C. truncatum*) e sugerem que este interessante fenómeno se deva a um mecanismo de troca genética. Estes autores também observaram que o hospedeiro (lentilha) produzia lenhina em resposta à infecção e também observaram a acumulação de compostos fenólicos que são tóxicos para os microrganismos e que podem estar associados à resistência à infecção. É sabido que a lenhificação precoce das células epidérmicas das folhas das plantas é um mecanismo que restringe a penetração e desenvolvimento fúngicos (Dalisay & Kuc, 1995). A acumulação de lenhina e compostos fenólicos está associada à resistência a patogénicos em diversas plantas (Kapadia *et al.*, 2013).

A resistência precoce à penetração dos fungos pode ser revelada na redução do número de apressórios, no número e tamanho dos tubos germinativos, na taxa de germinação e na massa de hifas; estes parâmetros podem ser descritos como componentes epidemiológicos de resistência parcial (Bouhassan *et al.*, 2003). A quantificação da massa de hifas não é possível com o tipo de microscopia usada, mas seria um bom dado a pesquisar em microscopia de fluorescência.

Tabela 5.2 Resultados de observações microscópicas da literatura consultada

Início da germinação	Início da formação dos apressórios	Modo de penetração	Nº TG	Dimensão dos conídios (µm)	Hospedeiro	Agente patogénico	Fonte
6 h	12 h	Directa	1	-	Folhas da cebola	<i>C. gloeosporioides</i>	Albert <i>et al.</i> , 2002
9 h	Não se formam	Directa	1	8-12x2,2-2,8	Folhas de Rícino	<i>C. gloeosporioides</i>	Babu <i>et al.</i> , 2011
Entre 24 e 48 h	Entre 24 e 48 h	Por ferida	-	-	Fruto da papaia	<i>C. gloeosporioides</i>	Capdeville <i>et al.</i> , 2007
3 a 6 h	6 a 12 h	Directa	1 a 3	11,4- 19,5 x 4,1- 5,8	Folhas e caule de lentilha (<i>Lens culinaris</i>)	<i>C. truncatum</i>	Chongo <i>et al.</i> , 2002
6 a 8 h	12 h	Directa e raramente por estomas	1 a 2	-	Folha do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>)	<i>C. gloeosporioides</i>	Ferreira <i>et al.</i> , 2009 ^a
2 a 3 h	-	-	1	-	Folhas da planta da borracha (<i>Hevea brasiliensis</i>)	<i>C. acutatum</i>	Fernando <i>et al.</i> , 2000
3 h	Não se formam	Estomas	1	-	Folhas de Amoreira (<i>Morus</i> sp.)	<i>C. gloeosporioides</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2001
3 a 4 h	5 a 6 h	Directa e raramente por estomas	1	-	Malvaceae weeds	<i>C. gloeosporioides</i>	Morin <i>et al.</i> , 1996
Antes das 24 h	Antes das 24h	Directa	-	-	Alfafa do campo (<i>Stylosanthes guianensis</i>)	<i>C. gloeosporioides</i>	Munaut e Maraite (1998)
2 h	4 h	-	-	-	Folhas de tomate (<i>Lycopersion esculentum</i>)	<i>C. coccodes</i>	Byrne <i>et al.</i> , 1997
-	-	-	1 a 2	10,0- (17,7) - 24,2 x 2,5- (3,7)-5,0	Folhas de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>)	<i>C. gloeosporioides</i> (17 isolados)	Mafacioli <i>et al.</i> , 2006
Rara antes dos 15 dias	-	-	-	12,7x 5,3	Feijão comum (<i>phaseolus vulgaris</i>)	<i>C. lindemuthianum</i> (6 isolados)	Roca <i>et al.</i> , 2003
-	-	-	-	8,2-21,6 x 2,0-4,7	Hortaliças solanáceas (pimenta, pimentão e jiló)	<i>C. gloeosporioides</i> + <i>C. acutatum</i> (30 isolados)	Tozze Júnior <i>et al.</i> , 2006
-	-	-	-	10,4-18,2 x 3,9 – 6,5	Mamoeiro (<i>Carica papaya</i>)	<i>C. gloeosporioides</i> + <i>C. acutatum</i> (29 isolados)	Andrade <i>et al.</i> , 2007

A tabela 5.2 sintetiza as observações microscópicas mais relevantes feitas por diversos autores.

Para entender as variações na expressão gênica em resultado da progressão da infecção, foi inicialmente estimada a expressão relativa no T0, ou seja, a quantidade que está presente nas células dos tecidos da folha em condições de desenvolvimento na ausência de doença, considerando-se a situação "normal" como folhas maduras saudáveis sem doenças sem feridas e sem inóculo. O procedimento adotado de normalizar as medições dos restantes tempos de recolha pós-inoculação tendo como base os níveis de expressão inicial permitiu assim entender se esta expressão pode ser responsável pelos diferentes níveis de tolerância entre genótipos, e se os tratamentos mantêm, diminuem ou aumentam a expressão de cada um dos genes investigados, na situação de ferida que potencia esse mesmo ataque. Como a ferida por si própria pode provocar uma resposta das células dos tecidos da folha, uma vez que indica ao hospedeiro que estão criadas condições favoráveis para a infecção por parte do patogénico, preparou-se amostras com ferida mas sem inóculo para serem recolhidas nos mesmos tempos de inoculação das amostras com ferida e inóculo de *C. gloeosporioides*. Os tempos de recolha das amostras foram escolhidos de forma a abranger a fase precoce de infecção, ou seja, 8, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. No entanto, os resultados devem ter em atenção que o efeito da senescência (resultante do destacamento da folha) ao longo do tempo de incubação em eventuais alterações na expressão gênica não foi avaliado.

A escolha dos genes candidatos à resistência foi feita de forma a incluir algumas famílias de genes de defesa de plantas mais comuns, como quitinases, proteínas relacionadas com a patogénese, peroxidases de ascorbato e curcinas que embora específicas de *J. curcas* são homólogas com proteínas inativadoras de ribossomas (RIPs) em diversas plantas. Como esperado, cada gene respondeu aos tratamentos com um padrão específico, revelando uma expressão diferencial de resposta em vias metabólicas diferentes.

A observação de que a expressão gênica relativa de *curcina "a"* (Figura 4.11) foi bastante mais intensa nas folhas com ferida mas sem inóculo pode sugerir que o ferimento dos tecidos foliares induz um aumento da expressão deste gene porque a curcina é uma proteína inativadora de ribossomas que em muitas plantas funciona como um mecanismo de defesa directamente concebidos para atingir herbívoros (Srivastava et al., 2012) e fungos (Devappa et al., 2010). A função antifúngica da curcina foi a razão que justificou que tenha sido escolhida como uma candidata putativa à resistência à antracnose.

No entanto, verificou-se que a presença do fungo *C. gloeosporioides* numa situação de ferimento dos tecidos foliares não induziu alterações significativas à expressão basal do gene de *curcina "a"*. Ou seja, a presença do fungo contrariou o efeito provocado pela ferida na expressão do gene da curcina "a". Estes resultados podem sugerir que *J. curcas* não reconheceu o *C. gloeosporioides* inicialmente como uma ameaça. Pode-se considerar que a não alteração da expressão do gene *curcina "a"*, isto é, uma ausência de sintomas da doença, na presença do fungo e da sua colonização dos tecidos vegetais como uma relação endofítica

(Kriel *et al.*, 2000). A produção atenuada de curcina “a” pode ser o factor que permite o desenvolvimento do fungo no tecido foliar e, depois, o acesso susceptível ficar incapaz de travar a colonização do fungo. No acesso resistente, nas amostras recolhidas ao fim de 72 horas de incubação, a expressão da curcina “a” aumenta na presença do fungo e aproxima-se da expressão no tratamento “apenas ferida” ao contrário do que aconteceu com o acesso susceptível. A resistência pode estar aliada à capacidade de reconhecimento do fungo como patogénico, por parte da planta.

Kumar & Kaushik (2013) isolaram fungos endofíticos nas folhas de *J. curcas* dos quais 4 isolados pertenciam à espécie *Colletotrichum truncatum*, que, apesar da sua natureza patogénica, afirmam ser o fungo endofítico predominante desta espécie vegetal. O *C. gloeosporioides* faz parte da microbiota normal das folhas aparentemente saudáveis de soja, apesar desta planta ser susceptível a este fungo (Pimentel *et al.*, 2006). Em frutos como a papaia, o crescimento do *C. gloeosporioides* após a penetração nos tecidos cessa até à maturação do fruto (Dickman & Alvarez, 1983). Estes dados indicam que as espécies de *Colletotrichum* estabelecem uma relação complexa com o hospedeiro.

No que diz respeito à pouco significativa expressão da curcina “b” em relação ao nível constitutivo, contrastando a expressão regulada positivamente da curcina “a”, indica que cada membro de uma dada família actua de forma diferenciada no processo fisiológico. Entretanto, Qin e colaboradores (2005) concluíram que o gene ao qual atribuíram o nome curcina 2 nas folhas é expresso em condições de stress ambiental mas não na presença dos fungos *C. gloeosporioides*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*.

A superior expressão das quitinases tipo III (Figuras 4.13 e 4.14) no acesso resistente (J49) foi sobretudo controlada pelo efeito da ferida. Este resultado sugere que mesmo que a expressão aumente por causa dos danos nos tecidos foliares, a maior contração de quitinases no acesso resistente poderá inibir com mais eficácia o avanço do fungo. Então pode ser sugerido que os genes *quitinase III “a”* e *“b”* poderão ser candidatos à resistência ao *C. gloeosporioides*. O facto do acesso J49 ter revelado susceptibilidade a *B. cinerea* e *Stemphylium* sp., pode indicar que *C. gloeosporioides* seja mais sensível a estas enzimas ou existem outros mecanismos de defesa que complementam a acção das quitinases.

Em trabalhos anteriores, verificou-se que as actividades da quitinase e da peroxidase elevam-se em folhas próximas da folha inoculada com *C. lagenarium* na planta do pepino entre 7 a 28 dias após a inoculação (Dalisy & Kuc, 1995). A síntese de enzimas antifúngicas como as quitinases é despoletada por elicitores derivados da parede celular do fungo, como oligómeros de *N*-acetilglucosamina, β -glucanos e proteínas da parede celular do fungo (Deiseng *et al.*, 2000). Têm sido detectados maiores quantidades de quitinase em cultivares resistentes de sorgo à podridão do grão mas Prom e colaboradores (2005) falharam em demonstrar uma associação entre a resistência e a acumulação de quitinase nas sementes.

A pulverização de quitosana (9 mg/mL), forma desacetilada da quitina, em folhas de feijoeiro reduziu em 50% a severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*) e aumentou a actividade de glucanase (Di Piero & Garda, 2008), possivelmente devido a indução de sinalização específica.

Zarandi e colaboradores (2011) concluíram que a expressão de quitinases do tipo III era significativamente maior em plantas não infectadas do genótipo de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), resistente a *Fusarium oxysporum* do que nas plantas não infectadas do genótipo susceptível; e a indução adicional dos genes 48 horas após inoculação do fungo no genótipo resistente eleva a resistência ao fungo.

Quanto à expressão de genes *Pathogenesis related* (Figura 4.15 e 4.16), destaca-se a sobreexpressão do transcripto *JcPR-b* às 24 horas após a inoculação no acesso resistente, o que pode indicar uma associação com os mecanismos de resposta diferenciais que explicam os distintos níveis de tolerância. Por outro lado, a expressão pouco significativa do gene *JcPR-10a* não corrobora com os resultados obtidos por Agarwal e colaboradores (2012), que verificaram que a expressão do mesmo gene era regulada positivamente entre as 12 e 48 horas após a inoculação do fungo *Macrophomina* em folhas de *J. curcas*. Este dado, sugere que a expressão do gene possa ser regulada por um mecanismo dependente do fungo. No entanto, a pouca variação da expressão deste gene, significa apenas que se mantém alta ao longo das 72 horas de incubação, pois o C_t inicial do gene é aproximadamente igual 20 (Tabela 4.6).

Os níveis de expressão dos genes de peroxidases de ascorbato quantificados não foram os esperados tendo como base outros resultados publicados, pois é sabido que a expressão de genes codificantes de APX é modelada por stresses bióticos e abióticos (Caverzan *et al.*, 2012) e seria de esperar que a ferida nos tecidos da folha e o ataque do fungo provocassem um efeito significativo.

Embora a expressão génica das peroxidases de ascorbato tenha sido pouco significativa ou reduzida em resposta à ferida e ao fungo, a actividade enzimática pode ter aumentado, em resultado de regulação pós-transcrição. Por exemplo, em rícino, os níveis constitutivos da actividade enzimática da peroxidase de ascorbato eram superiores nos genótipos resistentes ao *Fusarium oxysporum* (Kapadia *et al.*, 2013). Já Oliveira e colaboradores (2014) concluíram que a actividade enzimática APX em folhas do genótipo resistente do feijão-frade (*Vigna unguiculata*) à antracnose (*C. gloeosporioides*) aumentou para valores significativamente maiores daqueles do genótipo susceptível de 48 a 96 horas após a inoculação.

De um modo geral, esta primeira contribuição com um número reduzido de genes confirma que diferenças significativas importantes na expressão de genes de defesa ocorre apenas para um número limitado de membros, não sendo o efeito de uma alteração transcriptómica generalizada, tal como foi verificado para os 2 acessos de *J. curcas* contrastantes estudados. Este trabalho enfatiza o papel das quitinases tipo III e membros da família de PR como possíveis candidatos à resistência à antracnose e desenfatura o sistema antioxidativo pela fraca expressão mensurada nos genes da *cAPX* e *tAPX*.

6. Considerações finais

6.1. Conclusões

Nenhum acesso foi totalmente susceptível ou resistente aos fungos usados. A maioria (13 em 16) dos acessos de *J. curcas* foi avaliada como susceptível aos fungos *B. cinerea* e a *Stemphylium* sp. No entanto, apesar das altas percentagens de infecção para ambos fungos, os resultados destes dois fungos distingue-se por dimensões lesivas muito superiores no caso de *B. cinerea* que se traduz em maiores valores de severidade. Todos os acessos foram resistentes ou moderadamente resistentes a *A. alternata*, por causa da baixa percentagem de infecção e baixas dimensões das lesões registadas. Os resultados de rastreio a estes 3 fungos não se assemelham ao de *C. gloeosporioides*. Conclui-se, então, que o(s) mecanismo(s) de defesa de *J. curcas* à antracnose (*C. gloeosporioides*) não se estende(m) a outros fungos.

Os esporos iniciam a germinação e a formação de apressórios antes das 24 horas pós-inoculação. A penetração foi favorecida pela ferida e não se verificou tropismo dos tubos germinativos em direcção aos estomas. O acesso J49, resistente à antracnose, retardou a germinação e a maturação dos esporos de *C. gloeosporioides* em comparação com o acesso J51, susceptível. Este dado parece indicar que existe um metabolito secundário ou uma proteína em maior concentração no acesso resistente para inibir a maturação dos esporos do fungo.

A expressão dos genes foi influenciada pelos danos dos tecidos foliares causados pela ferida e a presença do fungo leva a uma expressão, regra geral, menor do que aquela apenas causada pela ferida, indicando que a presença do fungo nos tecidos foliares feridos contraria ou atenua o efeito provocado pela ferida *per sí*.

A expressão de um gene da curcina é aumentada na situação de ferida em ambos os acessos mas não na presença do fungo.

A expressão de *JcPR-10a* é mantida alta ao longo do tempo, sem sofrer alterações significativas, em ambos acessos. A expressão de *JcPR-b* é significativamente superior no acesso resistente do que no susceptível na presença do fungo em amostras recolhidas 24 horas após inoculação, mas essa expressão é condicionada pelo efeito da ferida. A expressão de tAPX é regulada negativamente em amostras recolhidas 8 e 24 horas após incubação na presença da ferida, mas 8 h após incubação há uma diferença significativa entre o efeito da ferida e a presença de inóculo.

O acesso J49 tem a expressão de 2 genes codificantes de quitinases do tipo III superior ao acesso susceptível J51, mas a expressão é induzida em resposta aos danos aos tecidos foliares e não pela presença do fungo. São os genes com maior apetência para candidatos à resistência à antracnose.

6.2. Perspectivas futuras

A presença e quantidade de ésteres de forbol tem um papel vantajoso na defesa contra ataques por pragas e doenças, mas é simultaneamente responsável por limitar o uso desta espécie como alimentar, para pessoas e animais. Assim, é da máxima importância investigar se a classificação dos genótipos obtida com base na sua diferente tolerância a um conjunto de organismos patogénicos (e representada na Análise de Componentes Principais da Figura 4.23) pode ser explicada pelo conteúdo destes compostos, a nível foliar, através de quantificação por técnicas de cromatografia, como o HPLC. O protocolo de extracção e quantificação dos ésteres de forbol havia sido iniciado e, até à presente data, encontra-se em fase de optimização do método.

A expressão de outras famílias de genes de defesa da planta contra doenças para encontrar genes candidatos à resistência deve prosseguir, como por exemplo de β -1,3-glucanases, proteínas inibidoras da poligalacturonase (PGIPs), glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e outras proteínas relacionadas com a patogénese (PRs). A disponibilidade da sequenciação do genoma permite que estes estudos sejam agora feitos numa abogagem global, através de técnicas modernas de RNA-Seq (sequenciação total de transcriptomas).

O aumento do tempo de observação de amostras por microscopia electrónica poderá permitir observar o surgimento de outras estruturas do fungo como a formação de acérvulos, conidióforos e hifas secundárias.

O acompanhamento da infecção por microscopia de fluorescência, poderá permitir a quantificação da massa de hifas que se desenvolve nas folhas resistentes vs susceptíveis.

Seria interessante averiguar se em *J. curcas* também há acumulação de compostos fenólicos e lenhina em resposta à inoculação de *C. gloeosporioides*, aplicando os corantes azul toluidino e floroglucinol, respectivamente, seguindo o protocolo de Chongo e colaboradores (2002).

O cruzamento entre acessos resistentes à antracnose e, posteriormente, novos rastreios à antracnose e testes ao rendimento do conteúdo de óleo nas sementes vai permitir que se proceda à selecção e clonagem dos acessos com as características desejadas.

O recurso a dois ou mais isolados diferentes do agente patogénico da antracnose para confirmar se a resistência é específica, isto é, dependente da interacção hospedeiro patogénico.

7. Referências bibliográficas

- Agarwal, P., Bhatt, V. Singh, R., Das, M.; Sopory, K. S., Chikara, J. (2012). Pathogenesis-Related Gene, Jcpr-10a from *Jatropha curcas* Exhibit RNase and Antifungal Activity. *Molecular Biotechnology*, 54:412–425.
- Amusa, N.A. (2000). Screening of cassava and yam cultivars for resistance to anthracnose using toxic metabolites of *Colletotrichum* species. *Mycopathologia*, 150: 137–142.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review Plant Biology*, 55: 373–399.
- Babu, A.M., Chowdary, N.B., Kumar, V., Rajan, M.V., Dandin, S.B. (2008). Infection process of *Colletotrichum dematium* on mulberry leaves: an unusual method of sporulation. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(4): 290-295.
- Bailey, J.A., O'connell, R.J., Pring, R.J., Nash, C. (1992). Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. In J.A. Bailey & M.J. Jeder (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. (pp. 88-113). Wallingford, Uk: Cab International.
- Basavaraju, P., Shailasree, S., Shetty, N.P., Kini, R.K., Jørgensen, H.J.L., Neergaard, E., Shetty, H.S., (2009). Infection induced oxidative crosslinking of hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) is associated with restriction of *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. *Journal of Plant Interactions*, 4:179–186.
- Basili, M., Fontini, F., (2012). Biofuel from *Jatropha curcas*: Environmental Sustainability and Option Value. *Ecological Economics*, 78:1-8.
- Borad, V., Sriram, S. (2008). Pathogenesis-Related Proteins for the Plant Protection. *Asian Journal of Experimental Sciences*, 22 (3): 189-196
- Bouhassan, A., Sadiki, M., Tivoli, B., Khiati, N. (2003). Analysis by detached leaf assay of components of parcial resistance of faba bean (*Vicia faba* L.) to chocolate spot caused by *Botrytis fabae* Sard. *Phytopathologia Mediterranea*, 42: 183-190.
- Brooks, J.W., Watson, D.G. (1985). Phytoalexins. *Natural Product Reports*, 2: 427-459.
- Buchwaldt, L., Anderson, K.L., Morrall, R.A.A., Gossen, B.D., Bernier, C.C. (2004). Identification of lentil germ plasm resistant to *Colletotrichum truncatum* and characterization of two pathogen races. *Phytopathology*, 94(3): 236-243.
- Calo, L., García, I., Gotor, C., Romero, L.C. (2006). Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a *Trichoderma* α -1,3-glucanase. *Journal of Experimental Botany*, 57(14): 3911-3920.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum* – Corrent Status and Future Directions. *Studies in Mycology*, 73: 181-213.
- Capdeville, G., Júnior, M.T.S., Santos, J.R.P., Miranda, S.P., Caetano, A. R., Falcão, R., Gomes, A.C.M.M. (2007). Scanning electron microscopy of the interaction

- Cryptococcus magnus* and *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya fruit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(11): 1537-1544.
- Carvalho, C.F., Clarindo, W.R., Praça, M.M., Araújo, F.S., Carels, N. (2008). Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science*, 174: 613–617.
 - Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 1011-1019.
 - Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., Pino, H., Espinoza, W. (2003). *Stemphylium vesicarium*, causante de quema foliar en ajo y cebolla en mérida, venezuela. *INCI*, 28(3): 174-177.
 - Chang, S., Puryear, J., Cairney, J. (1993). Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 113-116.
 - Chassot, C., Buchala, A., Schoonbeek, H.J., Métraux, J.P., Lamotte, O. (2008). Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *The Plant Journal*, 55: 555–567.
 - Chongo, G., Bernier, C.C. (2000). Disease incidence, lesion size, and sporulation in *Colletotrichum truncatum* as influenced by lentil genotype and temperature. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 236-240.
 - Chongo, G., Gossen, B.D., Bernier, C.C. (2002). Infection by *Colletotrichum truncatum* in resistant and susceptible lentil genotypes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 81-85.
 - Cisar, C.R., TeBeest, D.O. (1999). Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata*. *Current Genetics*, 35: 127-133.
 - Clarkson, J.P., Kennedy, R., Phelps, K. (2000). The effect of temperature and water potential on the production of conidia by sclerotia of *Botrytis squamosa*. *Plant Pathology*, 49: 119–128
 - Collinge, D.B., Jorgensen, H.J.L., Lund, O.S., Lyngkjaer, M.F. (2010). Engineering Pathogen Resistance in Crop Plants: Current Trends and Future Prospects. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 269-291.
 - Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K. (1993). Plant Chitinases. *The Plant Journal*, 3(1): 31-40.
 - Cordero, A.P., Sierra, J.R., Anaya, L.C., Palencia, K.P. (2011). Evaluación *in vitro* de la Actividad Inhibitoria de Extractos Vegetales sobre Aislados de *Colletotrichum* Spp. *Acta Agronómica*, 60 (2): 158-164.
 - Costa, M.R., Tenure, J.P.M., Arruda, K.M.A., Carneiro, J.E.S., Moreira, M.A., Barros, E.G. (2010). Development and characterization of common black bean lines resistant to anthracnose, rust and angular leaf spot in Brazil. *Euphytica*, 176: 149-156.
 - Dalisay, R.F., Kuc, J.A. (1995). Persistence of reduced penetration by *Colletotrichum lagenarium* into cucumber leaves with induced systemic resistance and its relation to

- enhanced peroxidase and chitinase activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47: 329-338.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G. (2001). Plant Pathogens and Integrated Defence Responses to Infection. *Nature*, 411: 826-833.
 - De Lorenzo, G., Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-Inhibiting Proteins in Defense against Phytopathogenic Fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4):295-299.
 - Dean, R., Van, K.J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Foster G. (2012). The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414–430.
 - Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R.K., Muck, A., Mithoferithofer, A., Shetty, S.H. (2010). Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. *Journal of Phytopathology*, 158: 585–593.
 - Deising, H.B., Werner, S., Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection*, 2: 1631-1641.
 - Devappa, R.K., Makkar, H.S., Becker, K. (2010). Nutritional, Biochemical, and Pharmaceutical Potential of Proteins and Peptides from *Jatropha*: Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 6543–6555.
 - Devappa, R.K., Makkar, P.S.H., Becker, K. (2011). Localisation of Antinutrients and Qualitative Identification of Toxic Componentes in *Jatropha curcas* Seed. *Journal Science Food Agriculture*, 92: 1519-1525.
 - Devappa, R.K., Rajesh, S.K., Kumar, V., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2012). Activities of *Jatropha Curcas* Phorbol Esters in Various Bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 57–62.
 - Di Matteo, A., Bonivento, D., Tsernoglou, D., Federici, L., Cervone, F. (2006). Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) In Plant Defence: A Structural View. *Phytochemistry*, 67: 528-533.
 - Di Piero, R.M., Garda, M.V. (2008). Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a actividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(9): 1121-1128.
 - Di Piero, R.M., Wulff, N.A., Pascholati, S.F. (2006). Partial Purification of Elicitors from *Lentinula edodes* Basidiocarps Protecting Cucumber Seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2): 175-180.
 - Dickman, M.B., Alvarez, A.M. (1983). Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*, 67: 748-750.
 - Divakara, B.N., Upadhyaya, H.D., Wani, S.P., Laxmipathi, G.C.L. (2010). Biology and Genetic Improvement of *Jatropha Curcas* L.: A Review. *Applied Energy*, 87: 732–742.
 - D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., Bellincampi, D. (2004). Polygalacturonases, Polygalacturonase-Inhibiting Proteins and Pectic Oligomers in Plant-Pathogen Interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696: 237-244

- Durand-Tardif, M., Pelletier, G. (2003). Apport de la Biologie Moléculaire et Cellulaire et de la Génétique à la Protection des Plantes. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 23–35.
- Ebrahim, S., Usha, K., Singh, B. (2011). Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *Communicating current research and technological advances*, 1043-1054.
- Esquerré-Tugayé, M.T. (2001). Plantes et Agents Pathogens, Une Liaison Raffinée et Dangereuse: L'exemple des Champignons. *Comptes Rendus De l'Académie Des Science*, 324: 899-903.
- Esquerré-Tugayé, M.T., Mazau, D., Barthe, J.P., Lafitte, C., Touzé, A. (1992). Mechanisms of Resistance to *Colletotrichum* Species. In J.A. Bailey & M.J. Jeder (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. (pp. 121-129). Wallingford, UK: Cab International.
- Fail, G.L., Langenheim, J.H. (1990). Infection Process of *Pestalotia subcutularis* on leaves of *Hymenaea courbaril*. *Cytology and Histology*, 80(11): 1259-1265.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M.J., Alcobendas, R., Artlip, T., Hernandez, J.A. (2011). Involvement of Cytosolic Ascorbate Peroxidase and Cu/Zn-Superoxide Dismutase for Improved Tolerance against Drought Stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2599–2613.
- Fernando, T.H.P.S., Jayasinghe, C.K., Wijesundera, R.L.C. (2000). Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research*, 104(6): 681-685.
- Fernando, T.H.P.S., Jayasinghe, C.K., Wijesundera, R.L.C. (2001). Cell wall degrading enzyme secretion by *Colletotrichum acutatum*, the causative fungus of secondary leaf fall of *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research*, 15(2): 195-201.
- Ferreira, J.B., Abreu, M.S., Alves, E., Pereira, I.S. (2009b). Aspectos morfológicos da colonização de *Colletotrichum gloeosporioides* em órgãos de plantas de cafeiros e com sintomas da mancha manteigosa. *Ciência e Agrotecnologia*, 33(4): 956-964.
- Ferreira, J.B., Abreu, M.S., Alves, E., Pereira, I.S., Fernandes, K.D. (2009a). Eventos do processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* inoculados em folhas de *Coffea arabica* L. *Summa phytopathology*, 35(4): 273-281.
- Ferreira-Pinto, M.M., Silva, M.J., Santos, M.R. (2011). Screening of *Jatropha Curcas* Genotypes to Anthracnose Caused by *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 76(4): 629-34.
- Fokunang, C.N., Akem, C.N., Ikotun, T., Dixon, A.G.O. (1999). Effect of planting season on cassava anthracnose disease development. *Crop Protection*, 18: 407-413.
- Fokunang, C.N., Dixon, A.G.O., Ikotun, T., Akem, C.N., Tembe, E.A. (2002). Rapid screening method of cassava cultivars for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. *Journal of Phytopathology*, 150: 6–12.
- Fokunang, C.N., Dixon, A.G.O., Ikotun, T., Asiedu, R., Tembe, E.A., Akem, C.N. (2001). *In vitro*, greenhouse and field assessments of cassava lines for resistance to

- anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis*. *Mycopathologia*, 154: 191-198.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6): 596-605.
 - Furlan, C.R.C., Dantas, A.C.M., Denardi, F. (2010). Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da EPAGRI à mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(2): 507-514.
 - Galván, G.A., Wietsma, W.A., Putrasemedja, S., Permadi, A.H., Kik, C. (1997). Screening for resistance to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) in *Allium cepa* and its wild relatives. *Euphytica*, 95: 173-178.
 - García-Guzmán, G., Dirzo, R. (2001) Patterns of Leaf-Pathogen Infection in the Understory of a Mexican Rain Forest: Incidence, Spatiotemporal Variation, and Mechanisms of Infection. *American Journal of Botany*, 88(4): 634–645.
 - Ginting, C., Maryono, T. (2009). Physic Nut (*Jatropha Curcas* L.) Diseases in Lampung Province. *Biotropia*, 16(1): 45-54.
 - Gübitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M. (1999). Exploitation of the Tropical Oil Seed Plant *Jatropha Curcas* L. *Bioresource Technology*, 67: 73-82.
 - Guyot, J., Omanda, E.N., Pinard, F. (2005). Some epidemiological investigations on *Colletotrichum* leaf disease on rubber tree. *Crop Protection*, 24: 65-77.
 - Han, Y., Gómez-Vásquez, R., Reilly, K., Li, H., Tohme, J., Cooper, R.M., Beeching, J.R., (2001). Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Expressed During Stress Responses in Cassava. *Euphytica*, 120: 59-70.
 - Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
 - Hirakawa, H., Tsuchimoto, S., Sakai, H., Nakayama, S., Fujishiro, T (2012). Upgraded genomic information of *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnology*, 29: 123-130.
 - Horbach, R., Quesada, A.R.N., Knogge, W., Deising, H.B. (2011). When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Pathology*, 168: 51-62.
 - Huang, M.X., Hou, P., Wei, E.Q., Xu, Y., Chen, F. (2008). A Ribosome Inactivating Protein (Curcin 2) Induced from *Jatropha Curcas* Can Reduce Viral and Fungal Infection in Transgenic Tobacco. *Plant Growth Regulation*, 54: 115–123.
 - Jones, S.B., Luchsinger, A.E. (1987). *Plant Systematics*. 2^ªed. McGraw-Hill: New York.
 - Kapadia, C.V., Mahatma, M.K., Shrivastava, V., Ahmad, T., Desai, R.T. (2013). Defense response of resistant and susceptible genotypes of castor (*Ricinus communis* L.) to wilt disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(2): 180-192.
 - Kasprzewska, A. (2003). Plant Chitinases – Regulation and Function. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 8: 809 – 824.

- King, A.J., He, W., Cuevas, J.A., Freudenberger, M., Ramiamanana, D., Graham, I.A. (2009). Potential of *Jatropha Curcas* as a Source of Renewable Oil and Feed. *Journal of Experimental Botany*, 60 (10): 2897-2905.
- Knothe, G. (2005). Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86: 1059-1070.
- Kobayasti, L., Adoriam, A.I., Neto, V.B.P., Alves, C.Z., Zuffo, M.C.R. (2011). Incidência de Fungos em Sementes de Pinhão-Manso. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 41(3): 385-390.
- Köhl, J., Groenenboom-de Haas, B.H., Kastelein, P., Rossi, V., Waalwijk, C. (2009). Quantitative Detection of Pear-Pathogenic *Stemphylium vesicarium* in Orchards. *Phytopathology*, 99(12): 1377-1386.
- Kohse-Höinghaus, K., Oßwald, P., Cool, T.A., Kasper, T., Hansen, N., Qi, F., Westbrook, C.K., Westmoreland, P.R. (2010). Biofuel Combustion Chemistry: From Ethanol to Biodiesel. *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 3572-3597.
- Kriel, W.M., Swart, W.J., Crous P.W. (2000). Foliar endophytes and their interactions with host plants, with specific reference to the Gymnospermae. *Advances in Botanical Research*, 33: 1-34.
- Kumar, A., Sharma, S. (2008). An Evaluation of Multipurpose Oil Seed Crop for Industrial Uses (*Jatropha Curcas* L.): A Review. *Industrial Crops and Products*, 28: 1-10.
- Kumar, M., Bhadauria, V., Singh, K., Singh, C., Yadav, A.K. (2013). Screening of chilli germplasm for resistance to *Alternaria* leaf spot disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(4): 463-469.
- Kumar, R., Srivastava, S., Sinha, A. (2012). Antifungal Activity of *Jatropha Curcas* Oil against some Seed-Borne Mycoflora. *Plant Pathology Journal*, 11(4): 120-123.
- Kumar, S., Kaushik, N. (2013). Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha Curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. *Plos One*, 8 (2): e56202.
- Kumar, S., Kaushik, N. (2013). Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. *PLoS ONE*, 8(2): e56202.
- Kumar, V., Gupta, V.P., Babu, A.M., Mishra, R.K., Thiagarajan, V., Datta, R.K. (2001) Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Collectotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. *Journal of Phytopathology*, 149: 629–633.
- Kunkeaw, S., Worapong, J., Smith, D.R., Triwitayakorn, K. (2010). An *in vitro* detached leaf assay for pre-screening resistance to anthracnose disease in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Australasian Plant Pathology*, 39: 547-550.
- Kusaba, M., Tsuge, T. (1995). Phylogeny of *Alternaria* Fungi Known to Produce Host-Specific Toxins on the Basis of Variation in Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. *Current Genetics*, 28: 491-498.

- Leone, G., Tonnejck, A.E.G. (1990). A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica*, 48: 87-90.
- Liu J.Q. Yang Y.F., Wang, C.F., Li, Y., Qiu, M.H. (2012). Three new diterpenes from *Jatropha curcas*. *Tetrahedron*, 68: 972-976
- Lou, J., Fu, L., Peng, Y., Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their Bioactivities. *Molecules*, 18(5): 5891-5935.
- Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Ferreira, E.M., Andrade, G.C.G., Vanetti, C.A., Binoti, D.H.B. (2009). Effects of leaf position, surface, and entry sites on *Quambalaria eucalypti* infection in eucalypt. *Tropical Plant Pathology*, 34(1): 003-009.
- Mahlein, A.K., Oerk, E.C., Steiner, U., Dehne, H.W. (2012). Recent advances in sensing plant diseases for precision crop protection. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 197-209.
- Makkar, H.P.S., Kumar, V., Becker, K. (2012). Use of detoxified jatropha kernel meal and protein isolate in diets of farm animals: chapter 21. In: Makkar H.P.S Biofuel co-products as livestock feed - opportunities and challenges, FAO.
- Manjunath, H., Nakkeeran, S., Raguchander, T., Anand, T., Renukadevi, P. (2011). Physiological characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, the incitant of anthracnose disease of noni in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(11): 1105-1114.
- Mehta, P.J., Wiltse, C.C., Rooney, W.L., Collins, S.D., Frederiksen, R.A, Hess, D.E., Chisi M., Tebeest, D.O. (2005). Classification and inheritance of genetic resistance to anthracnose in sorghum. *Field Crops Research*, 93: 1-9.
- Morant, Av., Jørgensen, K., Jørgensen, C. (2008). β -Glucosidases as Detonators of Plant Chemical Defence. *Phytochemistry*, 59: 1795–1813.
- Morin, L., Derby, J.A.L., Kokko, E.G. (1996). Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Malvae* on Malvaceae weeds. *Mycological Research*, 100(2): 165-172.
- Mukherjee, P., Varshney, A., Johnson, T.S., Jha, T.B. (2011). *Jatropha Curcas*: A Review on Biotechnological Status and Challenges. *Plant Biotechnology Reports*, 5: 197–215.
- Munaut, F., Maraite, H. (1998). Conidium germination and apressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Phytopathology*, 146: 19-26.
- Nishimura, S., Kohmoto, K. (1983). Host-specific toxins and chemical structures from *Alternaria* species. *Annual Review Phytopathology*, 21: 87-116.
- Nutter, F.W., Esker, P.D., Coelho, N.R.A. (2006). Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. *European Journal of plant Pathology*, 115: 95-103.

- Ober, C., Chupp, G.L. (2009). The Chitinase and Chitinase-Like Proteins: A Review of Genetic and Functional Studies in Asthma and Immune-Mediated Diseases. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9(5): 401-408.
- Obilo, O.P., Ikotun, B. (2008). Effect of canker size on availability of cassava planting materials in Nigeria. *African crop science journal*, 16(3): 203-209.
- Obilo, O.P., Ikotun, B., Ihejirika, G.O., Ibeawuchi, I.I., Oben, T.T. (2010). The effect of the incidence of cassava anthracnose disease (CAD) on the performance and yield of cassava cultivars. *Crop Protection*, 29: 482-486.
- Oliveira, J.T.A., Barreto, A.L.H., Vasconcelos, I.M., Eloy, Y.R.G. (2014) Role of Antioxidant Enzymes, Hydrogen Peroxide and PR-Proteins in the Compatible and Incompatible Interactions of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Genotypes with the Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 2(3).
- Oviedo, M.S., Sturm, M.E., Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Ramirez, M.L. (2013). Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2): 447-455.
- Pabon, L.C., Hernandez-Rodriguez, P. (2012). Importancia Química de *Jatropha Curcas* y sus Aplicaciones Biológicas, Farmacológicas y Industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2): 194-209.
- Parawira, W. (2010). Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. *Scientific Research and Essays*, 5(14): 1796-1808.
- Patade, V.Y., Khatri, D., Kumar, K., Grover, A., Kumari, M., Gupta, S.M., Kumar, D., Nasim, M. (2014). RNAi Mediated curcin precursor gene silencing in *Jatropha (Jatropha curcas L.)*. *Molecular Biology Reports*, 41: 4305–4312.
- Pimentel, I.C., Glienke-Blanco, C., Gabardo, J., Stuart, R.M., Azevedo, J.L. (2006). Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under Different Environmental Conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(5): 705-711.
- Prom, L.K., Isakeit, T., Perumal, R., Erpelding, J.E., Rooney, W., Magill, C.W. (2011). Evaluation of the Ugandan sorghum accessions for grain mold and anthracnose resistance. *Crop Protection*, 30: 566-571.
- Prom, L.K., Waniska, R.D., Kollo, A.I., Rooney, W.L., Bejosano, F.P. (2005). Role of chitinase and sormatin accumulation in the resistance of sorghum cultivars to grain mold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5565-5570.
- Prusky, D., Lichter, A. (2007). Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters*, 268: 1-8.
- Punja, Z.K., Zhang, Y.Y. (1993). Plant Chitinases and their Roles in Resistance to Fungal Diseases. *Journal of Nematology*, 25(4): 526-540.

- Qin, W., Ming-Xing, H., Ying, X., Xin-Shen, Z., Fang, C (2005). Expression of a Ribosome Inactivating Protein (Curcin 2) in *Jatropha Curcas* is Induced by Stress. *Journal of Biosciences*, 30(3): 351–357.
- Rahman, M., Ahmad, S.H., Mohamed, M.T.M., Rahman, M.Z.A. (2011). Extraction of *Jatropha Curcas* Fruits for Antifungal Activity against Anthracnose (*Colletotrichum Gloeosporioides*) of Papaya. *African Journal of Biotechnology*, 10(48): 9796-9799.
- Rakshit, K., Harinder, D., Makkar, P.S., Becker, K. (2010). *Jatropha curcas* toxicity: a review. *Journal of Toxicology Environment Health*, 13: 476-507.
- Reilly, K., Gomez-Vasquez, R., Buschmann, H. (2003) Oxidative Stress Responses during Cassava Post-Harvest Physiological Deterioration. *Plant Molecular Biology*, 53: 669-685.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57: 929–967.
- Rossi, V., Patteri, E., Giosué, S., Bugiani, R. (2005). Growth and Sporulation of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, on herb plants of orchard lawns. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 361-370.
- Rosslenbroich, H.J., Stuebler, D. (2000). *Botrytis Cinerea* - History of Chemical Control and Novel Fungicides for its Management. *Crop Protection*, 19: 557-561.
- Sá, D.A.C., Santos, G.R.S., Furtado, G.Q., Erasmo, E.A.L., Nascimento, I.R. (2011). Transporte, Patogenicidade e Transmissibilidade de Fungos Associados às Sementes de Pinhão-Manso. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(4): 663-670.
- Sabandar, C.W. (2013). Medicinal Property, Phytochemistry and Pharmacology of Several *Jatropha* Species (Euphorbiaceae): A Review. *Phytochemistry*, 85: 7-29.
- Santos, A.F., Alves, S.A.R., Júnior, A.G., Tessmann, D.J. (2008). Ocorrência do mofo cinzento causado por *Botrytis cinerea* em grevilea. *Tropical Plant Pathology*, 33(5): 386-387.
- Sato, S., Hirakawa, H., Isobe, S., Fukai, E., Watanabe, A. (2010). Sequence Analysis of the Genome of an Oil-Bearing Tree, *Jatropha curcas* L. *DNA Research – Oxford Journals*: 1-12.
- Schuchardta, U., Serchelia, R., Vargas, R.M. (1998). Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(1): 199-210
- Schwaiger, H., Pena, N., Mayer, A., Bird, D.N. (2011). Technologies to Produce Liquid Biofuels for Transportation: An Overview. Working Paper 72. CIFOR, Bogor, Indonesia.
- Sharma, A.K., Gangwar, M., Tilak, R., Nath, G., Sinha, A.S.K., Tripathi, Y.B., Kumar, D. (2012). Comparative in vitro Antimicrobial and Phytochemical Evaluation of Methanolic Extract of Root, Stem and Leaf of *Jatropha curcas* Linn. *Pharmacognosy Journal*, 4(30): 34-40.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012: ID 217037.

- Shikawa, T., Shigeoka, S. (2008). Recent Advances in Ascorbate Biosynthesis and the Physiological Significance of Ascorbate Peroxidase in Photosynthesizing Organisms. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72: 1143-1154.
- Shishkoff, N., Lorbeer, J.W. (1989). Etiology of *Stemphyium* leaf blight of onion. *Phytopathology*, 79: 301-304.
- Shishupala, S., Kumar, V.U., Shetty, H.S., Kumar, S.U. (1996). Screening pearl millet cultivars by ELISA for resistance to downy mildew disease. *Plant Pathology*, 45: 978-983.
- Silva, C.F.B., Michereff, S.J. (2013). Biology of *Colletotrichum* spp. And epidemiology of the antracnose in tropical fruit trees. *Revista Caatinga*, 26(4): 130-138.
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101: 1570-1580.
- Srivastava, M., Gupta, S.K., Abhilash, P.C., Singh, N. (2012). Structure prediction and binding sites analysis of curcin protein of *Jatropha curcas* using computational approaches. *Journal of Molecular Modeling*, 18: 2971–2979.
- Srivastava, S., Kumar, R., Sinha, A. (2012). Antifungal Activity of *Jatropha Curcas* Oil Against Some Seed-Borne Fungi. *Plant Pathology Journal*, 11(4): 120-123.
- Strange, R. N., Scott, P.R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 83-116.
- Sujatha, M., Reddy, T.P., Mahasi, M.J. (2008). Role of biotechnology interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jathropha curcas* L. *Biotechnology Advances*, 26: 424-435.
- Sutton, B.C. (1992). The Genus *Glomerela* and its Anamorph *Colletotrichum*. In J.A. Bailey & M.J. Jeger (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. (Pp. 1-23). Wallingford, Uk: Cab International.
- Thakur, M., Sohal, B.S. (2013). Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry*.
- Tokuoka, T., Tobe, H. (1995). Embryology and systematics of Euphorbiaceae sens. lat.: a review and perspective. *Journal of Plant Research*, 108: 97-106.
- Tullu, A., Buchwaldt, L., Lulsdorf, M., Banniza, S., Barlow, B., Slinkard, A.E., Sarker, A. Tar'an, B., Warkentin, T., Vanderberg, A. (2006). Sources of resistance to anthracnose (*Colletotrichum truncatum*) in wild *Lens* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 111-119.
- Usha, C., Rekha, P. (2012). Diversity of Fungi in the Phylloplane of *Jatropha Curcas* L. during Summer and Winter Season. *International Indexed & Referred Research Journal*, 4(36): 28–30.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3: RESEARCH0034.

- Vanzolini, S., Meorin, E.B.K., Silva, R.A., Nakagawa, J. (2010). Qualidade Sanitária e Germinação de Sementes de Pinhão-Manso. *Revista Brasileira de Sementes*, 32(4): 9-14.
- Vasconcelos, C.V., Silva, D.C., Carvalho, D.D.C. (2014). Ocorrência de *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. em tubérculos de batata, no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 44(2): 219-222.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., Van Kan, J.A.L (2007). Pathogen profile *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5): 561–580.
- Yong, H.Y., Bakar, F.D.A., Illias, R.M., Mahadi, N.M., Murad, A.M.A. (2013). *Cgl-STL2* is required for appressorium formation, sporulation and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4): 1241-1250.
- Zarandi, H.S., Bagheri, A., Baghizadeh, A., Moshtaghi, N. (2011). Quantitative Analysis of Chitinase Gene Expression in Chickpea. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(4): 681-685.
- Zhang, L., He, L.L., Fu, Q.T., Xu, Z.F. (2013). Selection of Reliable Reference Genes for Gene Expression Studies in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* using Real-Time Quantitative PCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 24338-24354.