

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Animal



**Avaliação de alterações na parede celular de frutos de pêra ‘Rocha’
como mecanismo de defesa contra podridões de pós-colheita, em
controlo biológico**

Maria João C. A. Prata

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Teresa Rebelo (FCUL)

Doutor Luís Filipe Goulão (IICT)

Dissertação

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2015

Dedico este trabalho à minha mãe,

Agradecimentos

Ao meu orientador Doutor Luís Goulão, pela oportunidade que me deu, ao aceitar-me como sua mestranda e pela disponibilidade e ajuda que me foi prestando ao longo do trabalho.

À minha coorientadora Professora Doutora Teresa Rebelo pela sua disponibilidade e rápida resposta, assim como pela sua paciência ao longo do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório por todos os momentos divertidos que tivemos e por toda a ajuda prestada, em especial à Vânia Cardoso e Sara Paiva, sem vocês teria sido muito mais difícil.

À Doutora Manuela Pinto pela disponibilidade e ajuda ao longo de todo o trabalho, nomeadamente na realização dos ensaios de biocontrolo.

À Professora Maria Manuel Cristovão por toda a sua simpatia e grande ajuda na realização deste trabalho.

Obrigado aos meus amigos por todo o apoio, ajuda e paciência para me aturar nas horas mais críticas, nomeadamente à Catarina Lopes, Liliana Farinha, Rui Antão e Eduardo.

E um muito obrigado aos meus pais pelo apoio incondicional, assim como ao resto da minha família. Sei que posso contar sempre convosco.

Resumo

As doenças pós-colheita de frutos, causadas por fungos, reduzem drasticamente a produção comercializável, representando significativos prejuízos económicos. A utilização de métodos de controlo biológico, com recurso a microrganismos antagonistas, tem vindo a ser estudada como uma estratégia alternativa ao uso de fungicidas. Em pêra 'Rocha', a espécie *Aureobasidium pullulans* mostrou-se eficaz como agente de biocontrolo contra a podridão azul causada pelo fungo *Penicillium expansum* embora os mecanismos subjacentes à sua acção na indução de respostas de defesa no hospedeiro permaneçam por elucidar. Com o presente trabalho pretendeu-se investigar, a nível bioquímico e molecular, a hipótese da parede celular das células do fruto desempenhar um papel no mecanismo de defesa ao restringir a progressão da infecção, após biotratamentos envolvendo o *A. pullulans*. Através de 3 abordagens complementares - quantificação de i) capacidade antioxidante e de compostos fenólicos, ii) actividade de enzimas modificadoras da parede celular por espectrofotometria e viscosimetria, e iii) expressão de genes envolvidos em alterações da firmeza da polpa por PCR quantitativo em tempo real, os resultados obtidos sugerem a existência de uma resposta do hospedeiro, dependente da sua exposição ao agente antagonista. Foi observado um decréscimo diferencial de algumas moléculas com capacidade antioxidante, o que sugere um aumento da lenhificação dependente da condição ensaiada, sendo mais significativo em amostras inoculadas com o patogénio. Os resultados de actividades enzimáticas totais e de expressão génica sugerem uma redução de despolimerização da parede celular e/ou aumento de respostas de defesa através da libertação de moléculas sinalizadoras, promovidos pelo *A. pullulans*. Estes dados suportam-se ainda por observações morfológicas nos vários tratamentos, onde se constatou que, na presença dos fungos em sinergia nos tratamentos de biocontrolo, a área necrótica era restrita ao local da inoculação, sugerindo um reforço da parede celular, bloqueando assim a proliferação do patogénio nos tecidos do hospedeiro.

Palavras-chave: *Pyrus communis*; conservação pós-colheita; biocontrolo; *Aureobasidium pullulans*; interecção hospedeiro-patogénio.

Abstract

Post-harvest diseases of fruit caused by fungi, drastically reduce marketable production, representing significant economic losses. The application of biological control methods, with the use of antagonist microorganisms has been studied as an alternative strategy to the use of fungicides. In pear 'Rocha', the species *Aureobasidium pullulans* was effective as a biocontrol agent against blue rot caused by the fungus *Penicillium expansum* although the mechanisms underlying its action in inducing defense responses in the host remain to be elucidated. The present study was intended to investigate the biochemical and molecular level, the hypothesis of cell walls of fruit cells play a role in defense mechanism to restrict the progression of infection after biotreatment involving *A. pullulans*. Through 3 complementary approaches – quantification of i) antioxidant capacity and phenolics ii) modifying enzyme activity of the cell wall by spectrophotometry and viscometry, and iii) expression of genes involved in changes of firmness by quantitative real-time PCR, the results obtained suggest the existence of a host response, dependent on its exposure to antagonist agent. A differential decrease of some molecules with antioxidant activity, suggesting an increased lignification dependent on the condition tested, being most significant for samples inoculated with the pathogen. The results of total enzyme activities and gene expression suggest a reduction in depolymerisation of the cell wall and / or increased defense responses through the release of signaling molecules promoted by *A. pullulans*. These data support itself by morphological features in the various treatments, where it was found that in the presence of the biocontrol fungi in synergy treatments, the necrotic area was restricted to the inoculation site, suggesting a strengthening of the cell wall, thus blocking proliferation the pathogen in the host tissues.

Keywords: *Pyrus communis*; postharvest conservation; biocontrol; *Aureobasidium pullulans*; host-pathogen interaction.

Lista de abreviaturas

ABTS: Ácido 2,2' Azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico)

AFase: α -L-arabinofuranosidase

β -Gal: β -Galactosidase

BSA: Albumina de soro bovino

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGase: Endo-1,4- β -glucanase

Endo-PG: Endo-poligalacturonase

Exo-PG: Exo-poligalacturonase

Exp: Expansina

IPG: Proteínas inibidoras da poligalacturonase

PMEI: Proteínas inibidoras da pectina metilestrase

PAL: Fenilalanina amonia-liase

PCR: Reacção em cadeia da polimerase

PDA: Agar de batata dextrosada

PG: Poligalacturonase

PLs: Pectate liases

PME: Pectina metilesterase

PMSF: Flureto fenilmetilsulfonil

ROS: Espécies reactivas de oxigénio

SDS: Dodecil sulfato de sódio

XEH: Xiloglucano-hidrolase

XET: Xiloglucano-endo-transglicosilase

XTH: Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase

Índice de Figuras

Figura 1.1: Maiores produtores de pêra na Europa (WAPA, 2013)	1
Figura 1.2: Aspecto geral de Pêra Rocha na fase de pré-colheita	2
Figura 1.3: Conselhos do Oeste de Portugal onde se produz pêra Rocha. Adaptado de ANP (2014).	2
Figura 1.4: Aspecto de Fungo <i>Penicillium expansum</i> responsável pela Podridão azul, em PDA.....	5
Figura 1.5: Aspecto de Pêra Rocha infectada, artificialmente, pelo <i>Penicillium expansum</i> , apresentando sintomas de Podridão azul.....	6
Figura 1.6: Aspecto de uma colónia em crescimento do fungo levediforme <i>Aureobasidium pullulans</i> , em PDA.....	9
Figura 1.7: Representação esquemática da parede celular primária vegetal (Adaptado de Villarreal, 2007).....	11
Figura 1.8: Esquema de representação dos mecanismos de defesa durante a interacção planta-fungo (Adaptado de Shah et al., 2012).....	13
Figura 1.9: Algumas possíveis interações entre hospedeiro, patogénio e antagonista e o ambiente (Adpatado de Liu et al., 2013).....	14
Figura 1.10: Esquema de representação da dinâmica da estrutura da parede celular durante a invasão por patogénios necrotóficos (Adaptado de Bellicampi et al., 2014).....	21
Figura 3.1: Esquema da Câmara de Newbauer (Adaptado de http://www.microbehunter.com/wp/wp-content/uploads/2010/06/counting_chamber7.jpg).....	25
Figura 3.2: Esquema da amostragem do ensaio de infecção das pêras.....	26
Figura 3.3: Aspecto do apparatus montado para a troca do tampão das amostras com colunas PD10.....	28
Figura 3.4: Apparatus usado: Pipeta de vidro de 0,1 ml utilizada na medição da viscosidade das amostras.....	31
Figura 3.5: Equipamento qTower 2.2 e o software qPCR Soft 1.1, utilizados no PCR quantitativo em tempo real.....	37
Figura 4.1: Aspecto dos resultados das inoculações em pêras ‘Rocha’ em resposta aos diferentes tratamentos, após 0 e 72 horas de inoculação. Aspecto ilustrativo de pêras, às 0 horas após a inoculação, quando inoculadas com: (A) água destilada (controlo); (B) <i>P. expansum</i> ; (C) <i>A. pullulans</i> ; (D) <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . Aspecto da pêra, às 72 horas após a inoculação, quando inoculadas com: (E) água destilada; (F) <i>P. expansum</i> ; (G) <i>A. pullulans</i> ; (H) <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i>	38
Figura 4.2.1: Resultados da quantificação da actividade antioxidante em pêras Rocha, pelo método	

de ABTS, às 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. A: Evolução em pêras não inoculadas com organismos patogénicos (controlo); B: Variação em pêras após os tratamentos, relativamente aos níveis nas amostras controlo. Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As barras representam os valores médios e as barras correspondem a \pm erro padrão. As letras A, B e C indicam diferenças estatisticamente significativas entre tempos de amostragem e as letras a, b e c indicam diferenças significativas entre tratamentos, em cada tempo, ambos a $P < 0,05$ 40

Figura 4.2.2: Resultados da quantificação da actividade antioxidante em pêras Rocha, pelo método de DPPH, às 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. A: Evolução em pêras não inoculadas com organismos patogénicos (controlo); B: Variação em pêras após os tratamentos, relativamente aos níveis nas amostras controlo. Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As barras representam os valores médios e as barras correspondem a \pm erro padrão. As letras A, B e C indicam diferenças estatisticamente significativas entre tempos de amostragem e as letras a, b e c indicam diferenças significativas entre tratamentos, em cada tempo, ambos a $P < 0,05$ 41

Figura 4.2.3: Resultados da quantificação da actividade antioxidante em pêras Rocha, pelo método de Folin-Ciocalteu, às 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. A: Evolução em pêras não inoculadas com organismos patogénicos (controlo); B: Variação em pêras após os tratamentos, relativamente aos níveis nas amostras controlo. Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As barras representam os valores médios e as barras correspondem a \pm erro padrão. As letras A, B e C indicam diferenças estatisticamente significativas entre tempos de amostragem e as letras a, b e c indicam diferenças significativas entre tratamentos, em cada tempo, ambos a $P < 0,05$ 42

Figura 4.3.1: A) Resultados da actividade enzimática da β -Galactosidase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$ 46

Figura 4.3.2: A) Resultados da actividade enzimática da α -L-arabinofuranosidase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$ 47

Figura 4.3.3.1: A) Resultados da actividade enzimática da Exo-poligalacturonase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe,

sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$ 49

Figura 4.3.3.2: A) Resultados da actividade enzimática da Endo-poligalacturonase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$ 50

Figura 4.3.4: A) Resultados da actividade enzimática da Pectina metilesterase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e a letra a indica que não houve diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$ 51

Figura 4.3.5: A) Resultados da actividade enzimática da Endo-1,4- β -glucanases em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e a letra a indica que não houve diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$ 52

Figura 4.4.1: Resultados da expressão génica de um membro das β -galactosidases em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B, C e D) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos, dentro de cada tempo $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão..... 54

Figura 4.4.2.1: Resultados da expressão da poligalacturonase 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão..... 55

Figura 4.4.2.2: Resultados da expressão da poligalacturonase 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores

representam a média ± erro padrão.....	56
Figura 4.4.3: Resultados da expressão da pectina metilesterase 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . As letras (a, b, c e d) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média ± erro padrão.....	58
Figura 4.4.4.1: Resultados da expressão da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A e B) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média ± erro padrão.....	61
Figura 4.4.4.2: Resultados da expressão da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A e B) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média ± erro padrão.....	62
Figura 4.4.5: Resultados da expressão da Endo-1,4- β -glucanase 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A: pêras em condições controlo, as letras (A e B) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B: Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média ± erro padrão.....	64
Figura 4.4.6.1: Resultados da expressão da expansina 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A: pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B: Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média ± erro padrão.....	66
Figura 4.4.6.2: Resultados da expressão da expansina 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A: pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B: Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . A letra b indica	

diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.....	67
Figura A: Curva de calibração do Ácido Ascórbico utilizada na determinação da capacidade antioxidante pela captação do radical livre ABTS.....	85
Figura B: Curva de calibração do Trolox utilizada na determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH.....	85
Figura C: Curva de calibração do Ácido Gálico utilizada na determinação dos compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu.....	86
Figura D: Curva de calibração do p-Nitrofenol, utilizada para quantificação da actividade enzimática da β -Galactosidase e α -L-Arabino furanosidase.....	86
Figura E: Curva de calibração do Ácido Galacturónico, utilizada na determinação da actividade enzimática da Exo-poligalacturonase.....	87
Figura F: Resultados da actividade da β -Galactosidase em pêras Rocha, 15 e 30 minutos após o início da reacção. H2O: pêras em condições controlo; Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . O * indica diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão. O tracejado e a linha é referente às amostras obtidas 12 e 24 horas após a inoculação, respectivamente.....	89
Figura G: Resultados da actividade da Alfa-L-Arabino furanosidase em pêras Rocha, 30 e 60 minutos após o início da reacção. H2O: pêras em condições controlo; Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . O * indica diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão. O tracejado e a linha é referente às amostras obtidas 12 e 24 horas após a inoculação, respectivamente.....	89
Figura H: – Resultados da actividade da Endo-Poligacturonase em pêras Rocha, 4 e 7 horas após o início da reacção. H2O: pêras em condições controlo; Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . O * indica diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão. O tracejado e a linha é referente às amostras obtidas 12 e 24 horas após a inoculação, respectivamente.....	90
Figura I: Resultados da actividade da Exo-Poligacturonase em pêras Rocha, 15 e 30 minutos após o início da reacção. H2O: pêras em condições controlo; Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . O * indica diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão. O tracejado e a linha é referente às amostras obtidas 12 e 24 horas após a inoculação,	

respectivamente.....	90
Figura J: Resultados da actividade da Pectina metilesterase em pêras Rocha, 15 e 30 minutos após o início da reacção. H2O: pêras em condições controlo; Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . O * indica diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão. O tracejado e a linha é referente às amostras obtidas 12 e 24 horas após a inoculação, respectivamente.....	91
Figura K: Resultados da actividade da Endo-1,4- β -glucanase em pêras Rocha, 3 e 6 horas após o início da reacção. H2O: pêras em condições controlo; Pe, pêras inoculadas com <i>P. expansum</i> ; Ap, pêras inoculadas com <i>A. pullulans</i> ; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, <i>A. pullulans</i> e <i>P. expansum</i> . O * indica diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$. Os valores representam a média \pm erro padrão. O tracejado e a linha é referente às amostras obtidas 12 e 24 horas após a inoculação, respectivamente.....	91

Índice de Tabelas

Tabela 1: Doenças pós-colheita e seus patogénios dos principais grupos de frutas (Adpatado de Sholberg e Conway, 2004).....	3
Tabela 2: Primers utilizados no estudo da expressão genética das amostras.....	34
Tabela 3: Resumo dos resultados obtidos nas diferentes abordagens realizadas.....	92

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VI
Lista de Abreviaturas	VII
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	XIII
1. Introdução	1
1.1 Pêra 'Rocha' e a sua importância	1
1.2 Doenças pós-colheita.....	3
1.2.1 <i>Penicillium expansum</i>	5
1.2.2 Podridão azul.....	6
1.3 Controlo de doenças pós-colheita através de antagonistas.....	7
1.4 <i>Aureobasidium pullulans</i>	8
1.5 Parede celular e a sua importância na patogenicidade.....	10
1.6 Mecanismo de defesa contra fungos.....	12
1.6.1 Sistema Antioxidante.....	14
1.6.2 Enzimas modificadoras da parede celular.....	15
1.6.2.1 β -Galactosidase.....	16
1.6.2.2 α -L-Arabinofuranosidase.....	16
1.6.2.3 Endo e Exo-Poligalacturonase.....	17
1.6.2.4 Pectina metilesterase.....	17
1.6.2.5 Endo-1,4- β -glucanase.....	18
1.6.2.6 Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase.....	18
1.6.2.7 Expansina.....	19
1.6.2.8 Actividade das enzimas e expressão de genes em plantas infectadas por fungos.....	19
2. Objectivo.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Material vegetal.....	23
3.2 Preparação dos meios de cultura e crescimento dos fungos.....	23
3.3 Preparação dos inóculos.....	24
3.3.1 <i>Penicillium expansum</i>	24

3.3.2 <i>Aureobasidium pullulans</i>	24
3.3.3 Contagem de esporos.....	24
3.4 Ensaio de biocontrolo.....	25
3.5 Preparação das amostras para os diferentes ensaios.....	26
3.6 Capacidade antioxidante e compostos fenólicos.....	26
3.6.1 Preparação do extracto de pêra.....	26
3.6.2 Determinação da capacidade antioxidante pela captação do radical livre ABTS.....	27
3.6.3 Determinação da capacidade antioxidante total pelo método de DPPH.....	27
3.6.4 Determinação dos compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu.....	27
3.7 Determinação de actividades enzimáticas.....	28
3.7.1 Extração das proteínas totais.....	28
3.7.2 Quantificação da proteína total extraída.....	28
3.7.3 Determinação da actividade de β -galactosidase.....	29
3.7.4 Determinação da actividade de α -L-arabinofuranosidase.....	29
3.7.5 Determinação da actividade de Exo-poligalacturonase.....	30
3.7.6 Determinação da actividade de Endo-poligalacturonase.....	30
3.7.7 Determinação da actividade de Pectina metilesterase.....	31
3.7.8 Determinação da actividade de Endo-1,4- β -glucanases.....	31
3.8 Quantificação da expressão génica de membros candidatos de famílias que actuam na parede celular.....	32
3.8.1 Preparação das amostras.....	32
3.8.2 Extração do RNA.....	32
3.8.3 Electroforese em gel de Agarose para avaliação da integridade do RNA.....	32
3.8.4 Avaliação da pureza e concentração do RNA extraído.....	33
3.8.5 Síntese de DNA complementar a partir do RNA total.....	33
3.8.6 Desenho dos primers.....	34
3.8.7 Cálculo da Eficiência de amplificação dos primers.....	35
3.8.8 Quantificação da expressão de genes candidatos com papel de modificação da parede celular por PCR quantitativo em tempo real (PCR real time).....	36
3.9 Análise Estatística.....	37
4. Resultados e discussão.....	37
4.1 Efeito das inoculações controladas na sanidade das pêras.....	38
4.2 Resposta da capacidade antioxidante e compostos fenólicos aos tratamentos impostos.....	39
4.3 Actividade enzimáticas de enzimas modificadoras da parede celular na pêra Rocha.....	45
4.3.1 β -Galactosidase.....	46

4.3.2 α -L-Arabinofuranosidase.....	47
4.3.3 Endo e Exo-Poligalacturonase.....	48
4.3.4 Pectina metilesterase.....	51
4.3.5 Endo-1,4- β -glucanase.....	52
4.4 Expressão génica de enzimas modificadoras da parede celular na pêra Rocha.....	53
4.4.1 β -Galactosidase.....	53
4.4.2 Poligalacturonase.....	55
4.4.3 Pectina metilesterase.....	58
4.4.4 Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase.....	60
4.4.5 Endo-1,4- β -glucanase.....	63
4.4.6 Expansina.....	65
4.5 Análise global dos padrões de expressão génica nas diferentes famílias.....	69
4.6 Diferenças entre resultados obtidos através de quantificação de actividades enzimáticas e expressão génica.....	69
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	70
6. Referências Bibliográficas.....	71
Anexo A.....	85
Anexo B.....	88
Anexo C.....	89
Anexo D.....	92

1. Introdução

As frutas e as hortaliças frescas são produtos alimentares de grande importância numa dieta equilibrada e saudável, estando bastante presentes na dieta mediterrânica. As frutas, em particular, são uma excelente fonte de nutrientes essenciais, como as vitaminas e minerais, para além de conterem fibras alimentares e compostos antioxidantes (Sanzani e Ippolito, 2011). Estes produtos são bastante susceptíveis, principalmente na fase pós-colheita, a distúrbios fisiológicos, danos mecânicos e infecções por fungos e bactérias (Terao et al., 2008). As doenças pós-colheita, principalmente as causadas por fungos, contribuem, em países europeus, para perdas económicas e de qualidade na ordem dos 25% (Matos e Barreiro, 2004). A aplicação de fungicidas sintéticos permitiu diminuir estas perdas, no entanto, a preocupação crescente com os efeitos destes químicos na saúde humana e no ambiente levou à procura de novas estratégias de controlo, nomeadamente, o controlo biológico através de antagonistas.

1.1 Pêra 'Rocha' e a sua importância

A pêra é uma fruta de climas temperados, sendo aceite em todo o mundo devido ao seu agradável sabor. Pertence à família *Rosaceae*, género *Pyrus* e existem 23 espécies selvagens catalogadas da Europa, Ásia e África. O género *Pyrus*, originou-se no Período Terciário, no oeste da China, havendo uma dispersão para o norte da Itália, Suíça, países da antiga Jugoslávia, Alemanha, Grécia, Moldávia e Ucrânia e para o Oriente, como o Irão, Uzbequistão, China, Japão, Coreia e Butão. Do ponto de vista do consumidor, existem dois grandes grupos de pêras, de acordo a espécie a que pertencem: as pêras europeias e asiáticas (Silva et al., 2014).

Na Europa, Portugal é o 5º maior produtor (Figura 1.1), com uma produção de,

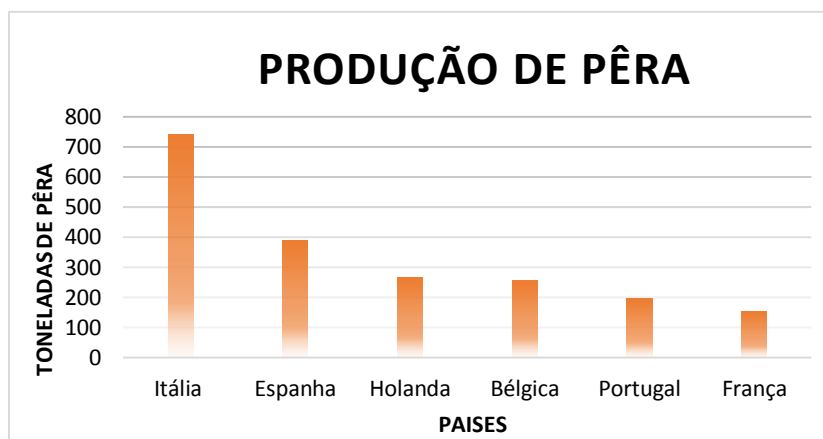


Figura 1.1 – Maiores produtores de pêra na Europa (WAPA, 2013).

aproximadamente, 200 mil toneladas anuais de pêra europeia (*Pyrus communis*) (Tomás e Azevedo, 2013; WAPA, 2013). A variedade 'Rocha' é a cultivar mais predominante (Santos, 2009).

A Pêra 'Rocha' (Figura 1.2), foi obtida por semente ao acaso em 1836, sendo originária de Sintra e apresenta uma excelente capacidade de conservação, para além de ser bastante resistente ao transporte e manuseamento (Marques, 2012). Tem, por isso, uma grande importância a nível comercial, não só pelas suas características singulares (como a textura, sabor) mas também pela sua durabilidade no período de conservação nos mercados e no consumidor. Cerca de 70% da produção de pêra 'Rocha', segundo os dados da Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha (2014), é consumida pelo mercado nacional, o que mostra ser um produto valorizado e importante na alimentação da população portuguesa.



Figura 1.2 – Aspecto geral de Pêra Rocha na fase de pré-colheita (foto da autora).

O fruto tem como características organolépticas: uma cor clara, entre o amarelo e o verde-claro; uma carepa típica ao redor do pedúnculo; e uma polpa com sabor, textura e odor característicos que lhe conferem vantagem comercial (Fernandes, 2009). Tem um tamanho médio entre 55-65mm, podendo chegar a calibres de 65-75mm se os pomares



Figura 1.3 - Concelhos do Oeste de Portugal onde se produz pêra Rocha. Adaptado de ANP (2014).

forem devidamente instalados, podados, irrigados e fertilizados (Pinho, 2011). A sua composição nutricional é bastante variável (consoante, por exemplo, o seu estado de maturação), apresentando uma quantidade de água de 85,5g /100g; rica em glúcidos (9,4g/100g), o que a torna uma boa fonte de energia; para além de conter diversas vitaminas, sendo a mais abundante a vitamina C (Fernandes, 2009). É conservado no período pós-colheita em atmosfera refrigerada, entre temperaturas de 0,5 e 0°C e humidade relativa entre 90 e 95%, sendo comercializado até 4 meses após a colheita, havendo um queda drástica da qualidade (textura, sabor) da pêra após esta data (Santos, 2009).

A Pêra 'Rocha' é considerada uma variedade de excelência e de origem portuguesa, de Denominação de Origem Protegida (DOP), produzida em vários concelhos da região do Oeste (ANP, 2014) - verificando-se as maiores produções em Torres Vedras, Bombarral, Cadaval e Caldas da Rainha (Figura 1.3) – onde se reúnem condições

favoráveis ao seu desenvolvimento (Reis, 2011).

Portugal é o país que mais produz pêra 'Rocha', aproximadamente 99% da produção mundial. Com uma área plantada de aproximadamente 10.000 hectares de pereiras, 97% são desta variedade, sendo produzida também em França, Espanha, Brasil (ANP, 2014). Desde a última década, que esta variedade, tem vindo a crescer no mercado externo, contribuindo para o saldo positivo da balança comercial de Portugal, para além de uma maior aceitação por parte dos consumidores o que leva a um aumento da produção deste fruto no território nacional (Henriques, 2009). Em 2013, a colheita de pêra 'Rocha' teve um aumento de 42,35%, face ao ano anterior (ANP, 2014).

A produção de alimentos, como os frutos frescos de espécies lenhosas, de grande investimento de instalação, tem risco acrescido de grandes perdas económicas (Mari et al., 2010). As doenças de pós-colheita contribuem significativamente para estas perdas, principalmente as causadas por fungos, pois reduzem drasticamente a produção que chega ao mercado, bem como o período de armazenamento e comercialização. No caso da pêra 'Rocha', a podridão azul causada pelo fungo *Penicillium expansum* merece especial atenção devido à sua grande incidência nesta variedade (Lara, 2014).

1.2 Principais doenças pós-colheita

Face à importância do consumo de fruta fresca nas dietas actuais, melhorias na conservação e o manuseamento, após a colheita, têm vindo a ganhar grande relevo nas últimas décadas (Janisiewicz e Korsten, 2002). O prejuízo associado a esta fase pode chegar até aos 20-30 % em termos de produção, sendo as doenças a causa preponderante (Fischer *et al.*, 2011).

São diversas as doenças pós-colheita que podem afectar os frutos, como se pode observar na tabela 1.

Tabela 1 - Doenças pós-colheita e seus patogénios dos principais grupos de frutos (Adaptado de Sholberg e Conway, 2004).

Fruto	Doença pós-colheita	Patogénio
Pomóideas (Pêra, Maçã)	Podridão preta	<i>Sphaeropsis malorum</i>
	Podridão azul	<i>Penicillium expansum</i>
	Podridão castanha	<i>Monilinia spp.</i>
	Podridão cinzenta	<i>Botrytis cinerea</i>
Citrinos (Laranja, Limão)	Podridão Alternaria	<i>Alternaria spp.</i>
	Antracnose	<i>Colletotrichum musae</i>
	Podridão azul	<i>Penicillium expansum</i>
	Podridão castanha	<i>Phytophthora spp.</i>

	Podridão verde	<i>Penicillium digitatum</i>
Pequenos frutos	Podridão azul	<i>Penicillium expansum</i>
	Podridão cinzenta	<i>Botrytis cinerea</i>
	Podridão Aspergillus	<i>Aspergillus niger</i>

No entanto, a sintomatologia associada a estas doenças é desenvolvida, maioritariamente, já na fase de pós colheita (armazenamento, transporte e comercialização) o que dificulta a sua deteção precoce e tratamento. A susceptibilidade destes alimentos a factores ambientais (exposição a temperaturas que não a óptima, diferenças nos níveis de oxigénio/dióxido de carbono) (Kader, 1986) e/ou a técnicas culturais (danos físicos por má manipulação) pode levar a grandes perdas pelo desenvolvimento de acidentes fisiológicos, mas também propiciar o desenvolvimento de doenças (Marques, 2012). A textura é das características mais importantes para o consumidor, e embora sendo um parâmetro multidimensional, a firmeza é considerada um dos atributos mais relevantes (Goulao e Oliveira, 2008), o que acarreta prejuízos económicos quando esta não responde às expectativas do consumidor. Reduções excessivas na firmeza do fruto podem resultar em aumento dos danos físicos facilitando o desenvolvimento de fungos e doenças.

Embora estas doenças só se manifestem depois da colheita, a infecção pode ter ocorrido no campo quando o fruto ainda se estava a desenvolver (Terao et al., 2008). São vários os factores que propiciam a infecção e desenvolvimento por parte de organismos patogénicos, tais como danos causados por insectos ou temperaturas extremas (Coates e Johnson, 1997). Ao condicionarem o ciclo de vida dos patogénios, as condições meteorológicas, que se fazem sentir antes ou durante a colheita, são a principal causa para o aparecimento de podridões (Marques, 2012). Para além disso, os frutos são um substrato óptimo para o desenvolvimento e o crescimento de microrganismos patogénicos (Ippolito e Sanzani, 2011), pela sua grande quantidade de nutrientes, pH baixo e diminuição da resistência intrínseca após a colheita (Liu et al., 2013). *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus* são alguns géneros de espécies de fungos responsáveis por muitas doenças importantes de pós-colheita (Liu et al., 2013).

Os fungos podem infectar de acordo com diversos mecanismos, sendo o primeiro passo a adesão dos conídios, esporos assexuais produzidos pelo micélio do fungo, à superfície da planta. Para que estes cresçam no tecido vegetativo requerem oxigénio (podendo contudo infectar com uma baixa percentagem deste), água e compostos orgânicos metabolizáveis (Sugar, 2002). Em seguida ocorre a germinação, penetração no hospedeiro, formação da lesão e expansão, e completando o ciclo - a esporulação (Bellincampi et al., 2014). Se existir uma ferida na epiderme, o fungo vai entrar e desenvolver-se. O ferimento quebra as barreiras naturais da célula vegetal (a cutícula e a parede

celular são a fronteira entre a célula e o ambiente), contra a infecção, levando à colonização do fungo, mesmo que a ferida seja pequena (Sugar, 2002). A produção de enzimas pelos fungos, que degradam a parede celular da planta, auxiliam na penetração e desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (Yao et al., 1996; Cantu et al., 2008).

Entre as várias espécies de fungos que causam podridões em pomóideas, há que destacar o *Penicillium expansum*, pela sua incidência significativa na pêra Rocha.

1.2.1 *Penicillium expansum*

O fungo *Penicillium expansum* (Figura 1.4) pertence à classe Eurotiomycetes, e é um dos

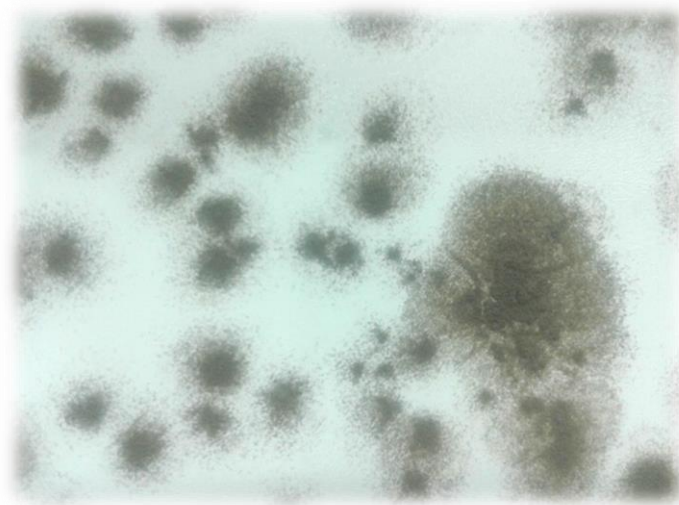


Figura 1.4 – Aspecto de fungo *Penicillium expansum* responsável pela Podridão azul, em PDA (foto da autora).

patógenos mais importantes na pós-colheita (Sugar e Powers, 1986). Pode causar doenças a, pelo menos, 21 géneros de plantas, frutas e vegetais (Li *et al.*, 2009) e infecta uma grande variedade de frutos de grande importância comercial como pêras, maçãs, morangos, pêssegos e uvas (Sanzani e Ippolito, 2011). É uma espécie psicrófila (podendo desenvolver-se a temperaturas baixas de 6°C negativos), tolerante a diferentes condições de pH, sobrevivendo em meios com pouca água (Frisvad e Samson, 2004) e necrotófico, infectando os frutos através da sua epiderme quando estes apresentam danos, devido a má manipulação (durante a colheita ou no processamento) ou causados por pragas (Corrent, 2007).

P. expansum produz conidióforos que vão ramificando até aparecerem os conídios, na extremidade. Estes são arrastados facilmente pelo vento e pela chuva, o que contribui para a sua grande dispersão e contaminação rápida do fruto (Marques, 2012). Cerca de 50% do apodrecimento pós colheita das frutas deriva da infecção por *P. expansum* (Yu et al., 2014).

1.2.2 Podridão azul

A área de penetração do *P. expansum* apresenta-se como uma mancha aquosa e translúcida com pequenas massas brancas e azuis (constituídas por micélios e esporos do fungo), ao qual se denominou podridão azul ou bolor azul (Figura 1.5).

Quando cultivadas em agar de batata dextrosada (PDA - Potato dextrose agar) as suas colónias são de um tom azul-esverdeado ou verde-escuro (Marques, 2012).

A infecção é de desenvolvimento rápido e em profundidade e os tecidos afectados podem ser destacados facilmente dos frutos (Sanhueza, 1993). Para além de provocar o apodrecimento do fruto, também produz um metabolito secundário que é tóxico para seres humanos e animais, a patulina (Singh e Sumbali, 2008).



Figura 1.5- Aspecto de Pêra Rocha infectada, artificialmente, pelo *Penicillium expansum*, apresentando sintomas de Podridão azul (foto da autora).

No caso particular da pêra Rocha, a incidência da podridão azul no fruto leva a prejuízos significativos, resultado da patogenicidade do fungo *P. expansum*, sendo necessário aplicar medidas de controlo, que combatam de maneira eficaz o fungo e diminuam a frequência e incidência da doença na fruta.

1.3 Controlo de doenças pós-colheita através de antagonistas

O combate das fisiopatologias, associadas à pós-colheita, tem tido ao longo dos anos várias frentes, desde da utilização de produtos fitoquímicos ao melhoramento genético.

O controlo de doenças pós-colheita pode ser feito de três maneiras: através de métodos físicos, químicos ou biológicos. O controlo físico consiste na aplicação de, por exemplo, tratamentos com calor, utilização de atmosferas controladas ou irradiação gama e ultravioleta (Francesco e Mari, 2014). No entanto, a grande variabilidade e inconsistência no desempenho associado a alguns tratamentos, o risco de efeitos adversos, o custo de aplicação e manutenção, variação da eficácia consoante as condições físicas e fisiológicas do hospedeiro (Palou, 2009) impedem o uso comercial alargado, sendo que a aplicação de alguns tratamentos sozinhos não é frequente (Palou, 2013). O controlo químico, que consiste na utilização de fungicidas sintéticos, tem sido usado durante décadas, mostrando-se capaz de preservar a qualidade dos frutos (Ippolito, 2002), e contribuir para o aumento do período de “vida de prateleira” (Mari et al., 2010). Existe uma vasta disponibilidade de novos produtos no mercado. No entanto, o aumento da desconfiança global, por parte dos consumidores, face aos perigos para a saúde humana e para o ambiente tem contribuído para a procura de novas estratégias de controlo. A acumulação de resíduos de pesticidas (Barreiro *et al.*, 2006), aparecimento de estirpes patogénicas resistentes e a baixa degradação dos produtos químicos no ambiente são problemáticas associadas ao controlo químico (Pais et al., 2008; Lidon et al., 2012).

O controlo biológico surge assim como uma alternativa, uma estratégia amiga do ambiente, no combate das doenças da pós-colheita. O controlo biológico centra-se, principalmente, na interação entre hospedeiro / patogénio / antagonista (Barreiro et al., 2006). Nos últimos anos, têm vindo a ser estudadas diferentes abordagens biológicas no controlo das doenças pós-colheita. Por exemplo, a utilização de substâncias vegetais naturais tem-se revelado uma estratégia eficaz no controlo de *Penicillium sp.* em pomóideas ou de *Botrytis cinerea* em pêras (Matos et al., 2008). Uma das metodologias mais promissoras consiste na utilização de microorganismos antagonistas dos patogénios, em especial, leveduras, fungos e bactérias (Janisiewicz e Bors, 1995; Lara e Barreiro, 2012) presentes naturalmente na superfície das plantas (Abano e Sam-Amoah, 2012). Neste contexto, entender o modo de acção dos antagonistas poderá ajudar a melhorar o seu desempenho e fiabilidade (Lidon *et al.*, 2012a). Embora a pêra 'Rocha' tenha uma boa capacidade de armazenamento, a utilização de fungicidas sintéticos tem sido a principal forma para evitar os prejuízos que surgem devido a lesões que acontecem no transporte ou durante o armazenamento dos frutos (Matos et al., 2008), pelo que, a aplicação de um antagonista poderá vir a ser uma alternativa mais segura e eficaz a longo prazo, por exemplo, no controlo de *P. expansum*.

Para que o processo de controlo da doença seja eficaz, as condições favoráveis ao

desenvolvimento do antagonista têm de ser as mesmas ou semelhantes aquelas a que o patógeno se desenvolve (Janisiewicz, 2002). O antagonista terá que apresentar vários atributos essenciais: sobreviver sob condições adversas, ser eficaz em diferentes hospedeiros, não produzir metabolitos tóxicos e ser eficaz a baixas concentrações (Abano e Sam-Amoah, 2012). Tendo em conta estas características, as leveduras são candidatos de excelência. Estas podem actuar de diversas maneiras controlando o desenvolvimento do fungo patógeno e conseqüentemente da doença, através de diferentes mecanismos: parasitismo, competição por nutrientes e espaço, indução de resistência na planta hospedeira, produção de enzimas extracelulares (Janisiewicz, 2002; Spêrandio, 2012).

Um dos fungos leveduriformes que mostrou grande interesse por não apresentar patogenicidade para os frutos e evidenciou uma importante actividade de biocontrolo antagonista, tanto *in vitro* como *in vivo*, contra o *Penicillium expansum*, foi a espécie *Aureobasidium pullulans*. No estudo realizado por Borges e seus colaboradores (2004) concluiu-se que o isolado de *A. pullulans*, epifítico encontrado na natureza em folhas de pereiras saudáveis, foi capaz de reduzir significativamente a deterioração pós-colheita causado pelo fungo *Penicillium expansum* (Borges et al., 2004), o que mostra que este antagonista poderá ser uma alternativa eficaz no controlo de doenças pós-colheita na pêra ‘Rocha’.

1.4 *Aureobasidium pullulans*

O fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* (Figura 1.6), pertencente à classe *Dothideomycetes* (Zara et al., 2008), é o antagonista mais usado para controlar a podridão azul causada pelo patógeno *Penicillium expansum*, em vários frutos (Ippolito et al., 2000; Ferreira-Pinto et al., 2008; Mari et al., 2012; Banani et al., 2014). Encontra-se naturalmente nas folhas e actua de diferentes maneiras: produzindo anti-fungicoenzimas (quitinases e glucanases), que actuam através da degradação das paredes celulares das espécies patogénicas (Alves, 2007), competindo por nutrientes e através da indução da defesa do hospedeiro (Vros et al., 2009). A colonização de *A. pullulans* afigura-se com uma coloração amarela clara, rosa clara ou castanho claro tornando-se escura com o desenvolvimento do fungo (Gaur et al., 2010). *Aureobasidium pullulans* tem a capacidade para sobreviver em diferentes tipos de habitat, é antifúngico, antimicrobiano e produz um polissacarídeo, o pullulans, que é usado na indústria farmacêutica e alimentar (Gaur et al., 2010).

Após a descoberta do seu efeito potencial, como antagonista no controlo da podridão, a investigação sobre o seu modo de acção tem vindo a aumentar. Em dois estudos realizados por Ferreira-Pinto e seus colaboradores (2008) e Pais e colaboradores (2008), com o objectivo de determinar a influência de diferentes substâncias usadas na conservação de pêra Rocha (Imazalil, cloreto de cálcio e bicarbonato de sódio), na acção de controlo do *A. pullulans*, concluiu-se que a

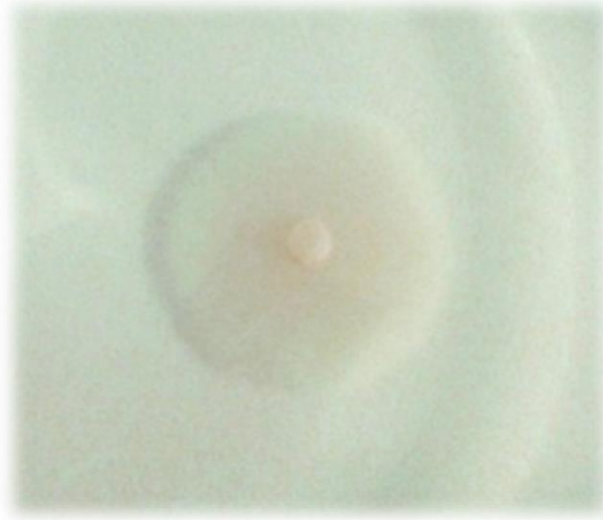


Figura 1.6 – Aspecto de uma colónia em crescimento do fungo levediforme *Aureobasidium pullulans*, em PDA (foto da autora).

eficácia do fungicida Imazalil, assim como do cloreto de cálcio, em doses reduzidas, é aumentada em combinação com o antagonista, demonstrando-se um efeito de sinergia. Pais e colaboradores (2008) sugerem que o efeito do antagonista pode ser explicado pela inibição do consumo de açúcares por parte do agente patogénico, dado que se observou um aumento destes (açúcares) nas pêras inoculadas com o antagonista. Noutro estudo, determinou-se a influência do oxigénio, do dióxido de carbono e do etileno, gases presentes nas atmosferas de conservação de pomóideas, no crescimento do antagonista, no período de armazenamento da pêra 'Rocha', demonstrando que estes gases não têm qualquer efeito no crescimento de *A. pullulans*, sendo mantida a sua eficácia quando os frutos são amadurecidos com etileno ou armazenados em atmosferas controladas (Martinez-Romero et al., 2010), o que lhe confere enorme potencial para ser usado em combinação com as estratégias convencionais de conservação em atmosferas controladas e modificadas.

Estudos, como os referidos acima, têm contribuído para um maior conhecimento das condições externas que podem influenciar o efeito do *Aureobasidium pullulans*.

1.5 Parede celular e a sua importância na patogenicidade

A forma, a arquitetura e propriedades biofísicas e biomecânicas das plantas e dos seus órgãos são determinadas pela matriz da parede celular em torno de cada célula (Cantu et al., 2008). A parede celular vegetal (Figura 1.7) é uma estrutura complexa e dinâmica, constituída por diversos polissacarídeos, agrupados em celulose e classes de hemiceluloses e pectinas (Lima et al., 2001; Cantu et al., 2008; Hématy et al., 2009) representando 35%, 15% e 40% da composição da parede primária, e compostos por monossacarídeos ou açúcares simples (arabinose, glucose, ramnose, galactose, xilose e manose) (Brett e Waldron, 1996). Para além da sua função de suporte e de estar envolvida no crescimento e desenvolvimento, através do controlo da velocidade e direcção da expansão de células ou do controlo do transporte intracelular através do apoplasto (Brett e Waldron, 1996), a parede celular confere protecção contra danos mecânicos e é o primeiro contacto na interacção com o ambiente, actuando significativamente em processos de sinalização (Puhmann et al., 1994). Nesta estrutura também se encontram presentes, contribuindo para as modificações das propriedades químicas e físicas da parede, glicoproteínas estruturais, compostos fenólicos, minerais e enzimas (Goulao et al., 2010). As alterações bioquímicas da parede são promovidas, maioritariamente, por enzimas, através da quebra de ligações glicosídicas terminais (exo-enzimas) ou formação de fragmentos com peso molecular mais baixo (endo-enzimas) (Lima et al., 2001), em processos bem coordenados e determinados geneticamente (Goulao e Oliveira, 2008). A lamela média é uma camada extremamente fina, que separa duas células vegetais, consistindo em grande parte de substâncias pécticas (Brett e Waldron, 1996). A parede primária consiste essencialmente em microfibrilhas de celulose envolvidas numa matriz de hemiceluloses e pectinas, proporcionando simultaneamente robustez e flexibilidade (Taiz e Zeiger, 2002). É a região mais dinâmica da parede, suportando o apoplasto em células em crescimento, protegendo contra patogénios, desidratação e outros stresses ambientais, proporcionando uma fonte de moléculas de sinalização e o meio de interacções célula-célula (McNeil et al., 1984). Esta vai sendo remodelada durante o crescimento e desenvolvimento da célula. Assim que esta atinge o seu crescimento final, em alguns tecidos, deposita-se uma parede secundária (Hématy et al., 2009). Esta, principalmente para apoio, contém lenhina, uma maior percentagem de celulose e diferentes tipos de hemicelulose, e reflecte o estado de diferenciação da célula (Taiz e Zeiger, 2002).

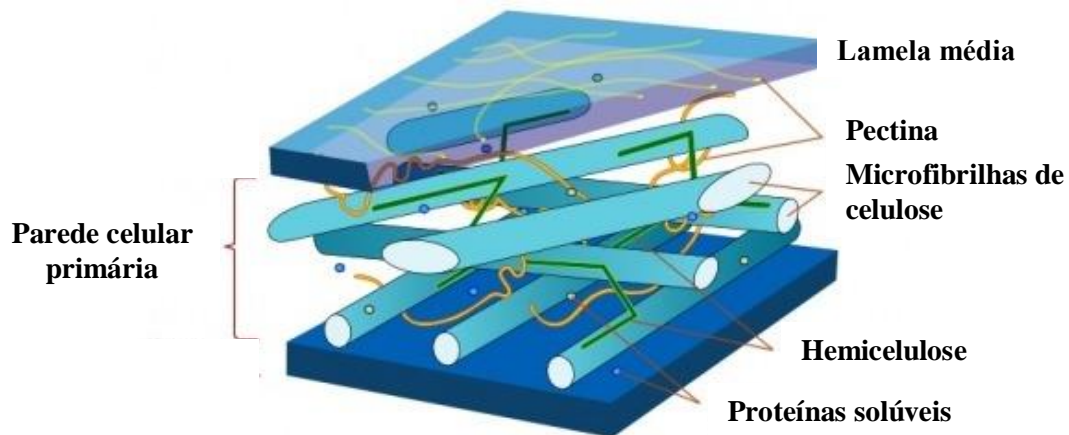


Figura 1.7 - Representação esquemática da parede celular primária vegetal (Adaptado de Villarreal, 2007).

A maturação, germinação de sementes e abscisão dos frutos são exemplos de processos que, mesmo não havendo crescimento celular, dependem amplamente da modificação desta estrutura. Por exemplo, a maturação dos frutos altera a composição e organização dos polissacarídeos presentes na parede celular, com vista ao amolecimento do fruto (Goulão et al., 2007). O processo de maturação tem como significado biológico conferir características organolépticas que tornem o fruto mais atractivo, com o objectivo de atrair organismos que possam auxiliar a dispersão das suas sementes, representando assim a fase terminal do desenvolvimento da planta (Goulao e Oliveira, 2008). No entanto, do ponto de vista do consumidor, a maturação do fruto poderá trazer aspectos indesejáveis (sabor e textura desagradáveis devido a sobre-maturação) que podem ser acentuados, por exemplo, devido a longos períodos de armazenamento ou devido a podridões causadas por patogénios (Goulao e Oliveira, 2008).

A remodelação e a reorganização da parede celular resultante da maturação (através de enzimas associadas ao metabolismo da parede), também contribui para uma redução da resistência da parede, tornando os frutos mais susceptíveis a serem infectadas por patogénios (Cantu et al., 2008). Estes aproveitam a vulnerabilidade do hospedeiro, durante as alterações características da maturação e conseqüentemente do amolecimento, para infectar os frutos (Sasidharan et al., 2011).

Mais importante, a infecção por parte de organismos patogénicos requer uma desestruturação física da barreira que é a parede celular, para que seja possível a entrada na célula. A interação entre fitopatogénios e as plantas passa assim pela parede celular e é determinado de acordo com três classes de patogénios: biotróficos, que necessitam das células vivas; necrotóxicos (*P. expansum* ou *B. cinerea*), que matam as células e vivem dos tecidos mortos; e hemibiotróficos, que são indiferentes quanto ao estado da célula que podem usar (Underwood, 2012). A patogenicidade dos fungos pode

envolver uma extensiva quebra da matriz da parede do hospedeiro (Cantu et al., 2008).

1.6 Mecanismo de defesa contra fungos

Os fungos utilizam diferentes estratégias para contornar as defesas criadas pelo hospedeiro, por exemplo, neutralizar a acção de compostos antimicrobianos, produção de enzimas que degradam a parede celular das células vegetais, produção de substâncias tóxicas para o hospedeiro (Cantu et al., 2008). Fungos, como o *Penicillium expansum*, segregam enzimas que degradam a cutícula e a parede celular (Miedes e Lorences, 2006), como cutinases, pectinases e endoglucanases (Hématy et al., 2009). Além de criarem acesso físico ao interior da célula, os oligossacarídeos gerados, durante a fragmentação da parede, fornecem ao fungo uma fonte de carbono (açúcares, aminoácidos, ácidos gordos). Por outro lado, estes oligossacarídeos (produzidos pela degradação de paredes celulares tanto da planta como de patogénios) também induzem respostas na planta, através da activação de cascatas de sinalização (Shah et al., 2012) no tecido do hospedeiro. Como parte dessa resposta, as plantas podem produzir proteínas de defesa que inibem as enzimas produzidas pelo fungo. Diferentes mecanismos são activados para combater os efeitos causados pelo fungo: produção de espécies reactivas de oxigénio e de compostos antimicrobianos (Hématy et al., 2009); acumulação de calose e lignina (Flors et al., 2008; Ahmad et al., 2011; Luna et al., 2011; Xu et al., 2011; Eynck et al., 2012; Sattler e Funnell-Harris, 2013; Vilanova et al., 2014); ácido jasmónico e ácido salicílico, hormonas que medeiam as defesas da planta induzindo genes relacionados com a patogénese (Peng et al., 2012) ou o reforço nas ligações entre proteínas estruturais (Bily et al., 2003; Deepak et al., 2010). No entanto, uma abrangente remodelação envolvendo todos os polímeros que constituem a parede celular é esperada e ficou já demonstrado que o stress biótico regula a acumulação de proteínas secretadas envolvidas em extensas modificações da parede celular com o objectivo de preservar a sua integridade, nomeadamente poligalacturonases, galactosidases, α -L-arabinofuranosidases, α -glucosidases, xilanases, xiloglucanases ou β -1,3-endoglucanases (De Launois et al. 2014). Outro estudo demonstrou a elevada prevalência de glicosil hidrolases entre as proteínas produzidas em plantas infectadas com fungos (Kim et al., 2013). O fungo, por sua vez, produz proteínas de defesa, para impedir a degradação da sua própria parede celular. O sucesso do fungo ou da planta é, em grande parte, determinado pela interacção entre todos os mecanismos de defesa (Figura 1.8) (Shah et al., 2012; Delaunois et al., 2014).

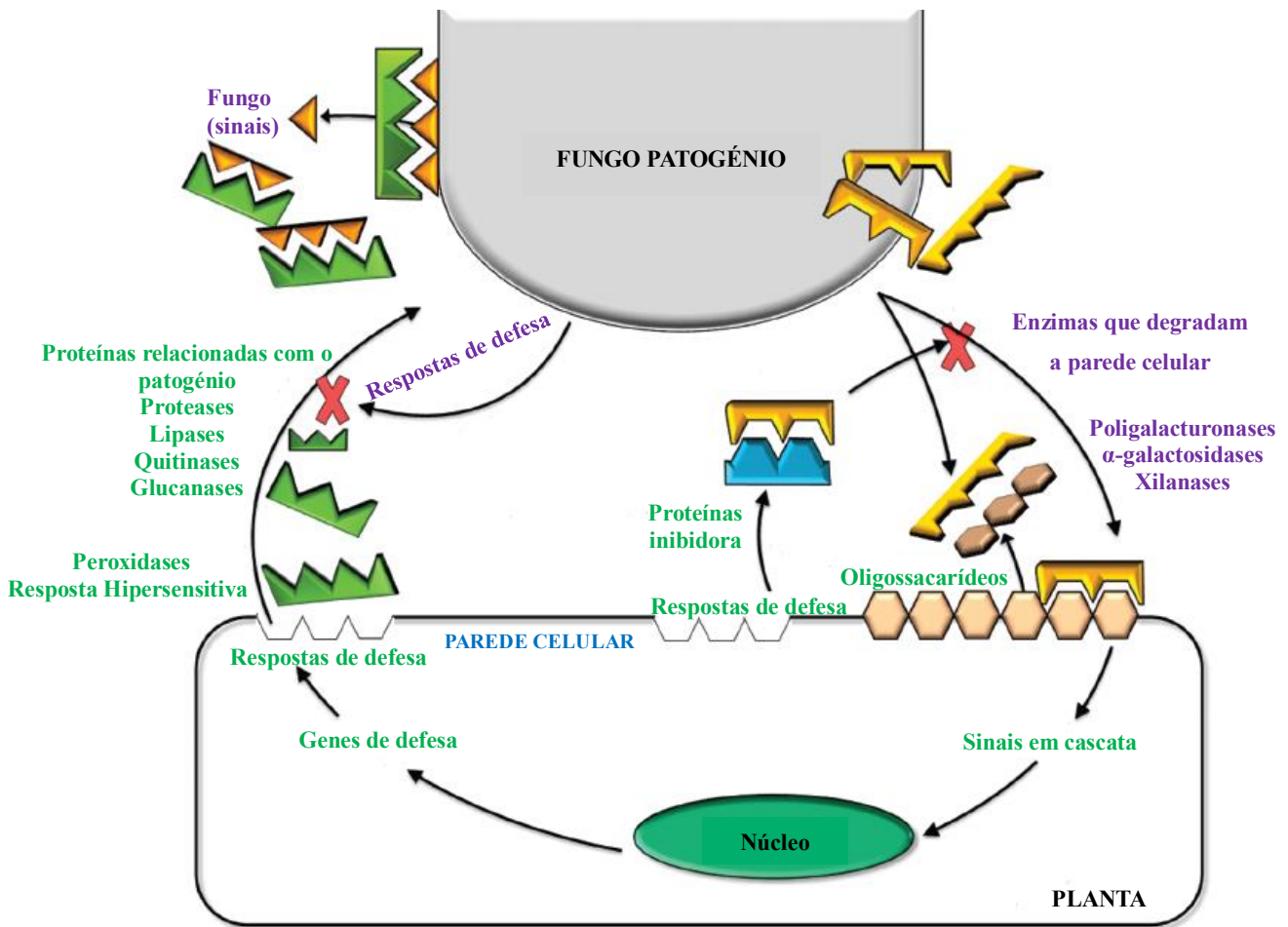


Figura 1.8 - Esquema de representação dos mecanismos de defesa durante a interação planta-fungo (Adaptado de Shah et al., 2012; Delaunois et al., 2014).

A parede celular representa, assim, uma fonte de nutrientes, ao mesmo tempo que uma barreira de acesso físico na infecção, levando os fungos a utilizar estratégias para contornar esta defesa (Cantu et al., 2008). A aplicação de antagonistas permitirá controlar o acesso do fungo a esses nutrientes através de, por exemplo, indução de resistência ou de ativação do sistema antioxidativo (Liu et al., 2013), hipóteses que irão ser testadas neste trabalho. Na figura 1.9 estão representadas algumas das possíveis interações entre antagonista-hospedeiro-patógeno.

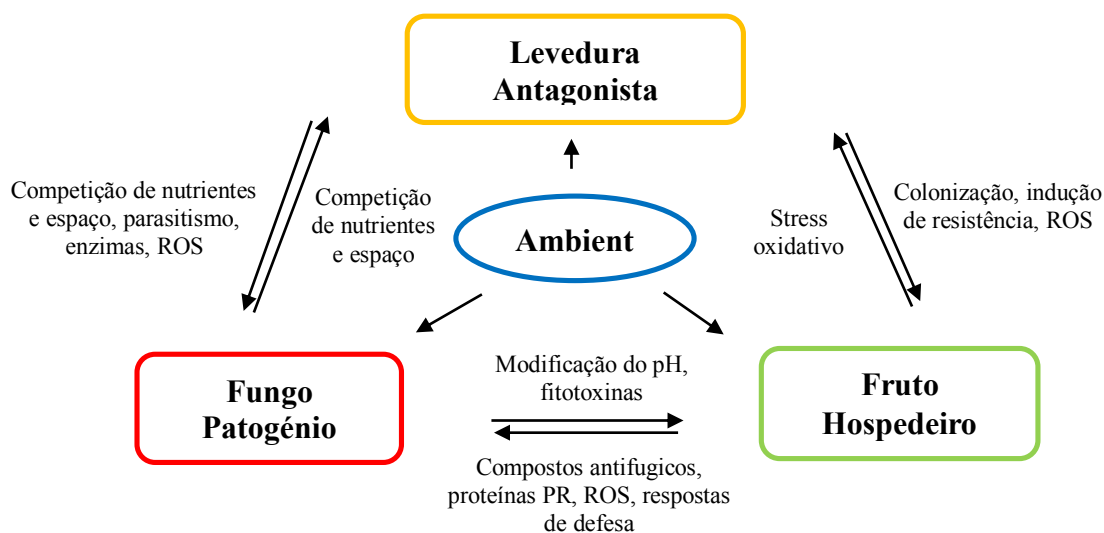


Figura 1.9 – Algumas possíveis interações entre hospedeiro, patogénio e antagonista e o ambiente (adaptado de Liu et al., 2013).

1.6.1 Sistema Antioxidante

Há várias décadas que se tem conhecimento que as plantas desenvolvem mecanismos de defesa contra patogénicos, através de modificações estruturais (evitando que o patogénico obtenha nutrientes) e bioquímicas (produção de metabolitos secundários tóxicos, expressão de genes associados ao patogénio) (Tavares, 2009). Um dos mecanismos de defesa primários é a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Em excesso, os ROS podem levar à oxidação dos ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, debilitando o metabolismo e a integridade da célula (Xu et al., 2008). Quando um patogénio é reconhecido, há uma acumulação de ROS, proteínas antimicrobianas e fitoalexinas, culminando na morte da célula, de modo a restringir e impedir o desenvolvimento do patogénio (Huckelhoven, 2007). Esta resposta é denominada de resposta hipersensitiva (RH) e contribui também para a sinalização celular associada à indução de expressão de genes de defesa (O'Brien et al., 2012). A produção de ROS tem vindo a ser associada à formação de barreiras defensivas através da participação da formação de glicoproteínas, calose, lenhina e outros compostos fenólicos (Vilanova et al., 2014). Mas, nem sempre a resposta hipersensitiva é eficaz, nomeadamente contra necrófagos, um exemplo é descrito no estudo realizado por Govrin e Levine (2000), onde foi observado que apesar da RH ser eficiente contra patogénios biotróficos, este mecanismo não tinha o mesmo efeito contra patogénios necrotróficos, nomeadamente o *B. cinerea*, facilitando a sua colonização nas plantas. Quando em contacto com um ferimento na superfície dos frutos, também a levedura antagonista contacta com os ROS, podendo perder a viabilidade, no entanto, quando

expostas a níveis elevados destes, esta têm a capacidade de adaptar-se, o que lhe confere uma característica essencial como agente de biocontrolo (Liu et al., 2013), permitindo que interaja e controle o patogénio, para além de induzir na planta mecanismos de defesa. No estudo realizado por Lidon e seus colaboradores (2012a), que teve como objectivo o estudo da acção do *A. pullulans* no controlo do *P. expansum*, concluiu-se que o antagonista pode promover níveis elevados de oxidação no tecido, que poderá ajudar na sinalização celular responsável por desencadear mecanismos de controlo da acção do patogénio (Lindon et al., 2012a).

Para combater a produção excessiva dos ROS e os seus efeitos prejudiciais, a planta desenvolveu um sistema de protecção, através da acumulação de moléculas antioxidantes, capazes de neutralizar a sua acção. As células contêm grandes quantidades de moléculas com função antioxidante, como os polifenóis ou o ácido ascórbico (Pisoschi et al., 2009), para além de enzimas com capacidade antioxidativa, catalase, superóxido dismutase ou ascorbato peroxidase (Reyes et al., 2007).

A acumulação de compostos fenólicos, por exemplo, na zona de invasão do patogénio, tem vindo a ser associada com a resistência da planta à doença, em diversas interacções planta-patogénio, através da restrição do crescimento do patogénio (Liu et al., 2005). Em maçãs inoculadas com *P. expansum* e com o antagonista *Pichia guilliermondii* observou-se um aumento dos compostos fenólicos sugerindo que estes poderão ter um papel fundamental na supressão da progressão da podridão azul (Farahani et al., 2013).

1.6.2 Enzimas modificadoras da parede celular

Para além da acumulação de ROS, são também induzidas outras respostas defensivas com a presença do patogénio. A interacção entre patogénios e plantas leva à produção de sinais, resultando em respostas de defesa, nomeadamente através do reforço da barreira física (parede celular) presente nas células do hospedeiro (Vera-Estrella et al., 1994). Por isso, a integridade da parede é importante na planta face à susceptibilidade aos patogénios (Lionetti et al., 2012).

A identificação e caracterização da transcrição dos genes responsáveis pelas modificações da parede celular vegetal, em diferentes processos biológicos, assim como do modo de acção das respectivas enzimas, tem vindo a ser estudado durante as últimas décadas em diferentes hospedeiros. A maturação, em particular, é acompanhada pela desestruturação extensa da parede celular, que também contribui para a susceptibilidade a patogénios, uma vez que diversas enzimas produzidas pelos frutos, durante a maturação, são também produzidas pelos patogénios que invadem os tecidos. Estas enzimas degradam a parede e ajudam na colonização e no crescimento dos patogénios (Cantu et al., 2007).

Diversas enzimas actuam nas várias ligações existentes entre polímeros, promovendo modificações na sua estrutura, participando nos processos que controlam a integridade do fruto durante a maturação (Goulão e Oliveira, 2008), assim como aquando da infecção por patogénios (Bellicancampi et al., 2014). Entre elas podemos destacar: β -galactosidase, α -L-arabinofuranosidase, poligalacturonases, pectina metilesterase, endo-1,4- β -glucanases e xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase e expansina pelo seu papel directo nas modificações dos três grupos de polissacarídeos (hemicelulose, pectina e celulose). A diversidade destas enzimas reflecte assim a complexidade estrutural e a dinâmica da parede celular, o que contribuirá na elucidação sobre se há um papel desta estrutura na indução de resistência no fruto ao patogénio, induzida pelo antagonista.

1.6.2.1 β -Galactosidases

As β -galactosidases (β -Gal) são enzimas amplamente distribuídas, presentes em vários organismos desde das bactérias aos humanos, participando em vários processos de modificação da parede celular (Gantulga, 2008). Faz parte das glicosidases, enzimas que removem os terminais das cadeias, promovendo a interacção entre polissacarídeos (Goulao e Oliveira, 2007), catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas de β -glicosídeos, contribuindo para uma modificação da textura do fruto (Fonseca et al., 2005), sendo responsáveis por tornar a pectina mais solúvel e menos agregada, o que também torna este polissacarídeo mais susceptível à acção por parte de outras enzimas. Ao destabilizarem a matriz da parede celular por alterarem ramificações nos principais polímeros, estas enzimas contribuem para a dissociação da parede celular que leva ao amolecimento dos frutos (Goulao, 2005).

Esta família apresenta várias isoformas, sendo diferenciadas pela sua especificidade ao substrato e pelo padrão de expressão génica relacionado, o que, segundo Tateishi (2008), implica que cada isoforma possa interferir de determinada forma na modificação da parede celular (Ross et al., 1994). Em tomate, espécie modelo para frutos, foram identificadas três isoformas da enzima, em que sete genes da β -galactosidase expressam durante o crescimento do fruto e seis deles durante a maturação (Goulao e Oliveira, 2008). No estudo da actividade desta enzima utilizam-se substratos sintéticos como, por exemplo, o p-nitrofenil-beta-D-galactopiranosídeo (Ross et al., 1994).

1.6.2.2 α -L-Arabinofuranosidases

As enzimas α -L-arabinofuranosidases (AFase) modificam ramificações de pectinas, o que lhes altera a solubilidade ou liberta resíduos de arabinose que funcionam como sinalizadores, modulando o controlo de outras modificações da parede celular (Goulao, 2005) e tem sido associada a um papel

importante na maturação dos frutos (Wei et al., 2012). Assim como a β -Gal, também a AFase faz parte das glicosidases (Goulao e Oliveira, 2007). Esta hidrolisa resíduos de α -L-arabinofuranosídeos, presentes nas pectinas e hemiceluloses (Tateishi, 2008). No estudo da actividade desta enzima utilizam-se substratos sintéticos como, por exemplo, o p-nitrofenil-beta-D-arabinofuranosídeo (Mwaniki et al., 2007).

1.6.2.3 Endo e Exo-Poligalacturonase

As poligalacturonases são enzimas produzidas por bactérias, plantas e fungos patogénicos das plantas, sendo importantes no seu desenvolvimento. São das enzimas mais bem estudadas, que quebram as ligações α -1,4-glicosídicas, presentes entre resíduos de ácidos poligalacturónicos (Fonseca et al., 2005; Jurick, 2010). Estas dividem-se em dois tipos, endo e exo. As endo-poligalacturonases quebram uma cadeia poligalacturónica no seu interior, aleatoriamente, formando cadeias mais pequenas (Gomathi e Gnanamanickam, 2004). A acção de endo-PGs causa despolimerização das cadeias, levando ao afrouxamento da parede celular, podendo também contribuir para a sua solubilização (Goulao, 2005). As exo-poligalacturonases quebram também uma cadeia poligalacturónica, mas na extremidade não-redutora, libertando ácido galacturónico (Gomathi e Gnanamanickam, 2004). Tal como β -galactosidases e α -L-arabinofuranosidases, a acção de exo-PGs pode ter efeitos na promoção da solubilização por alterar as ramificações das pectinas ou actuar com modo de sinalização, ao libertar monossacáridos terminais que desencadeiam sinais em cascata (Goulao, 2005).

O papel das poligalacturonases na maturação dos frutos é bem conhecido. De facto, na maturação e amolecimento de tomate há um aumento significativo na expressão e actividade destas enzimas (revisto por Goulao et al., 2010). A sua inibição resulta também numa redução da susceptibilidade do tomate a patogénicos (revisto por Goulao, 2005).

1.6.2.4 Pectina metilesterase

A pectina é um polissacarídeo fundamental na organização estrutural e integridade da parede celular, interagindo com as microfibrilhas de hemicelulose e celulose, detendo assim um papel relevante na estrutura das células, com relevância na textura dos frutos e vegetais (Jurick, 2010). É constituída por três componentes principais, os homogalacturanos e os ramnogalacturanos (I e II), sendo que o primeiro, o mais abundante, poderá ter um efeito na adesão da célula, integridade do tecido e contribuir para a sinalização (Lionetti et al., 2012). A pectina é composta maioritariamente por ácidos galacturónicos (açúcares), ligados entre si por ligações β -1,4-glicosídicas, e é sintetizada

no complexo de Golgi na forma metil esterificada. A metil esterificação da pectina é controlada principalmente pela actividade da pectina metilesterase (Volpi et al., 2011). Esta enzima pode actuar de acordo com dois mecanismos distintos: através de desmetilação aleatória ao longo da cadeia de ácido poligalacturónico, pode tornar as pectinas mais susceptíveis à acção de hidrolases específicas (Goulao et al., 2007). Por outro lado, se a desmetilação ocorrer em porções longas e seguidas nas cadeias, promovem a ligação do cálcio às pectinas, formando uma estrutura denominada “egg-box”, aumentando a capacidade desta de formar um gel rígido (Taiz e Zeiger, 2002). Destas reacções resulta a libertação de grupos carboxilos e metanol (Micheli, 2001), o que modifica o pH do apoplasto e auto-regula a sua actividade, bem como a actividade de outras famílias de enzimas que actuam na parede celular (Goulao et al., 2010). É, por isso, uma enzima de relevância nas interacções planta-patogénio, dado que contribui para o aumento ou redução da susceptibilidade das pectinas, assim como da acessibilidade da parede celular à acção de outras enzimas, por exemplo, poligalacturonases (Lionetti et al., 2012).

A regulação da actividade da pectina metilesterase é feita pelo pH e pela força iónica, assim como pelas proteínas que inibem esta enzima, inibidores da pectina metilesterase (PMEI). A expressão de ambas as enzimas (PME e PMEI), durante a patogenicidade, poderá advir de uma resposta defensiva por parte da planta ao patogénio (Lionetti et al., 2012).

1.6.2.5 Endo-1,4- β -glucanase

As endo-1,4- β -glucanases (EGase) são enzimas produzidas pelos fungos, bactérias, protozoários e plantas (Taiz e Zeiger, 2002). Foram associadas com a hidrólise de ligações β -1,4-glicosílicas de xiloglucano (*in vivo*), no entanto ainda não foi identificado o substrato para a maioria das suas isoformas. A acção destas enzimas poderá ter efeitos na promoção da degradação das regiões não cristalinas das microfibrilhas da celulose, modificando a organização destas, uma vez que as EGases não conseguem degradar a parte cristalina da celulose (Goulao, 2005).

Em algumas espécies, pensa-se que haverá uma correlação entre a enzima e o amolecimento do fruto, no entanto, noutros frutos o seu papel é minimizado (Goulao e Oliveira, 2008). No tomate, pelo menos dois genes (*Cell* e *Cel2*) das EGases apresentam uma maior expressão, coincidindo com a maturação (revisto por Goulao, 2005). Por outro lado, a sua ausência reduz a susceptibilidade do tomate ao *Botrytis cinerea* (Flors et al., 2007).

1.6.2.6 Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase

O xiloglucano pertence ao grupo das hemiceluloses, e tem um papel importante na

extensibilidade e robustez da parede, através da ligação que estabelece com as microfibrilhas de celulose por pontes de hidrogénio, impedindo a sua agregação (Rose et al., 2002). A enzima xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH) tem duas funções biológicas, podendo actuar como endotransglicosilase (XET) ou como hidrolase (XEH). Um determinado membro desta família pode ter apenas uma ou ambas as actividades (Goulao, 2005). Esta família é assim responsável por cortes nas moléculas de xiloglucano, desestruturando a matriz celulose-xiloglucano, sendo por isso uma enzima associada a todos os processos em que a modificação da parede celular tem papel relevante, inclusive durante o amadurecimento (Fonseca et al., 2005). Quando a actividade é de transglicosilase, estas enzimas cortam as hemiceluloses e voltam a ligá-las entre si noutro ponto (Taiz e Zeiger, 2002; Goulao e Oliveira, 2007). A enzima actua clivando uma cadeia de xiloglucano e transferindo-o para outra cadeia mais pequena também de xiloglucano (Fry et al., 1992; Fonseca et al., 2005).

1.6.2.7 Expansina

As expansinas são proteínas que induzem a extensão e stress-relaxamento associado ao pH, sem haver uma quebra hidrolítica significativa na parede. Estas catalisam o deslizamento entre as microfibrilhas de celulose e a matriz de polissacarídeos (Fonseca et al., 2005). A acção das expansinas prende-se na promoção da quebra das ligações de pontes de hidrógenio entre as microfibrilhas de celulose e polímeros de xiloglucano firmemente associados, após a ligação com a superfície da celulose, levando ao afrouxamento das associações entre os polímeros polissacarídeos estruturais da parede (Goulao, 2005)

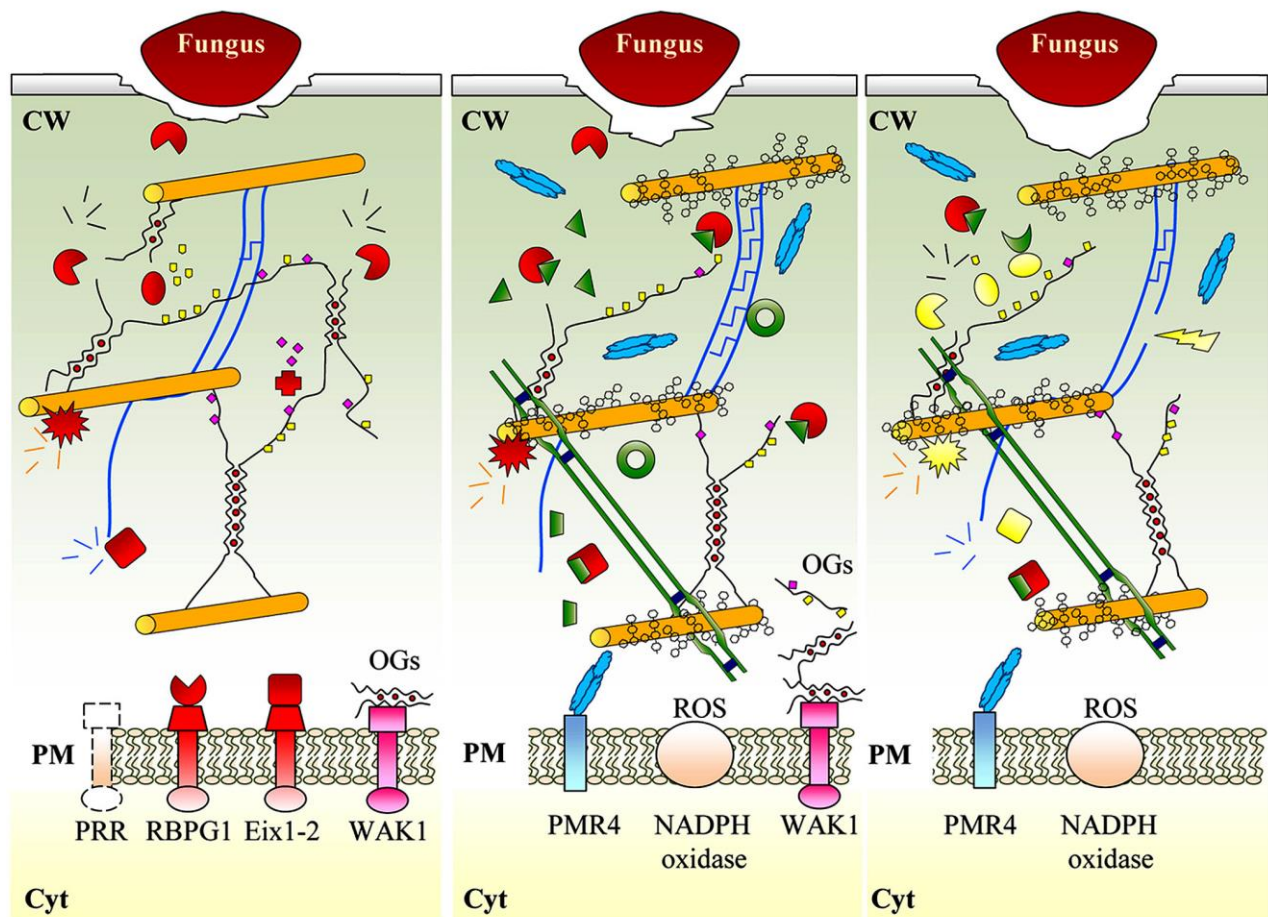
A identificação de enzimas modificadoras da parede celular associadas à maturação, no tomate, sugere que as expansinas podem estar relacionadas com o amolecimento dos frutos (Goulao e Oliveira, 2008), através do desagregamento da parede celular (Cantu et al., 2008). Pelo menos sete isoformas da expansina são expressas durante o crescimento e o desenvolvimento do tomate, sendo a *LeExp1* (gene *Expansina 1* identificada nesta espécie) relacionada com a maturação (revisto por Goulao et al., 2010). Ensaio independentes feitos no tomate, através da supressão e sobre-expressão da *LeExp1*, sugerem um efeito de promoção das condições necessárias à actuação de outras enzimas (revisto por Goulao et al., 2010).

1.6.2.8 Actividade das enzimas e expressão de genes em plantas infectadas por patogénios

Frutas, como pêras, maçãs, pêssegos e tomates, são particularmente susceptíveis a doenças pós-colheita. A parede celular torna-se assim uma barreira fundamental no combate aos patogénios (Cantu et al., 2007). O conhecimento sobre os patogénios, dos seus antagonistas e dos mecanismos

de defesa por parte da planta quando exposta a estes, é um tema que tem vindo a ser desenvolvido, no entanto, são muitas as questões ainda sem resposta, nomeadamente, as alterações que ocorrem na parede celular dos frutos, induzidas pelo antagonista, que podem funcionar como barreira física ou estrutura de sinalização durante a infecção do hospedeiro, desenvolvimento do fungo e, posteriormente, da progressão da doença.

O metabolismo da parede celular tem vindo a ser estudado, maioritariamente no contexto da maturação, tendo como foco o estudo das enzimas responsáveis por modificar os seus componentes, assim como a sua contribuição na susceptibilidade dos frutos a patogénios. Os tecidos do fruto são particularmente ricos em pectinas, perfazendo cerca de 40% do total dos polissacarídeos da parede celular (Cantu et al., 2007). Diversas enzimas são responsáveis pelas alterações na pectina, poligalacturonase, pectina metilesterase, β -galactosidase, podendo contribuir para a susceptibilidade e resistência dos frutos aos patogénios. Por exemplo, a sobreexpressão da *PME* em morangos torna-os mais resistentes ao *B. cinerea*, através da activação de respostas defensivas, libertando oligolacturonoides (que se formam após a degradação do homogalacturano) que constituem uma resposta de defesa (Raiola et al., 2010). Na *Arabidopsis*, esta enzima é necessária para a susceptibilidade ao *B. cinerea*, assim como a acção de *LePG* e *LeExp1* facilita a susceptibilidade ao patogénio em tomate (Raiola et al., 2010). Em maçãs infectadas por *Penicillium expansum*, verificou-se um aumento das actividades da PG e da PME e, conseqüentemente, a progressão da infecção (Miedes e Lorences, 2006), assim como uma diminuição da actividade do XTH (Miedes e Lorences, 2004; Muniz-Bertomeu e Lorences, 2013). Já a supressão dos genes *EGase* está associada a mudanças de expressão de genes relacionados com a patogénese, sugerem que a actividade da EGase influencia as respostas de defesa no tomate (Flors et al., 2007). Também em tomate, foi observado que a sobreexpressão de proteínas inibidoras da poligalacturonase reduzem a área de lesão da inoculação com *B. cinerea*, o que, por sua vez, foi também observado em plantas de *Arabidopsis* e do tabaco (Lorenzo e Ferrari, 2002). Estes estudos suportam a ideia de que a infecção de tecidos dos frutos por patógenos necrotróficos é acompanhada pela desestruturação da parede celular que acompanha, por exemplo, também o amolecimento (Cantu et al., 2007). Na figura 1.10, abaixo, é possível observar a dinâmica da parede celular aquando da infecção por fungos necrotóficos, focando as modificações nas pectinas (poligalacturonases) e na fracção celulose-hemicelulose (expansinas).



- FUNGAL ENZYMES**
- ★ Celulase
 - ◐ PG
 - Hemicelulase
 - PME
 - ✚ Acetil esterases
- PLANT DEFENCE PROTEINS**
- ◄ PGIP
 - ◐ PMEI
 - ◓ XI
 - POX
 - Extensina
- HOST SUSCEPTIBILITY FACTORS**
- ★ Celulase
 - ◐ PG
 - Hemicelulase
 - PME
 - ⚡ Expansina
- CELL WALL COMPONENTS AND CROSSLINKS**
- Celulose
 - Hemicelulose
 - Pectina
 - Linhina
 - - - Fragmentos da parede
 - Calose
 - Ca²⁺ Ligação Pectina
 - Ligação de Ditirosina
 - Ligação de ácido ferúlico
 - Grupo Metil
 - ◆ Grupo Acetil

Figura 1.10 – Esquema de representação da dinâmica da estrutura da parede celular durante a invasão por patógenos necrotóxicos (adaptado de Bellicampi et al., 2014).

Em muitas interações planta-patógeno, o estabelecimento da infecção ocorre devido a uma resposta inadequada do hospedeiro ao patógeno invasor, mesmo havendo a activação de mecanismos

de defesa por parte da planta, estes poderão não ser eficazes, em termos de tempo e intensidade, resultando na infecção dos tecidos.

A aplicação de leveduras antagonistas individualmente ou em combinação com compostos químicos têm mostrado um potencial eficaz em reduzir a podridão pós-colheita em frutos. Por exemplo, o antagonista *Cryptococcus laurentii* aumenta a actividade de enzimas de defesa, como a fenilalanina amonia liase (PAL), peroxidase e polifenoloxidase, reduzindo a doença causada pela *Alternaria alternata* em pêras (Tian et al., 2006), assim como no fruto do tomate cherry, induzindo a expressão de proteínas que poderão aumentar a resistência do fruto aos patogénios (Jiang et al., 2008). Por outro lado, a combinação do calor e da levedura *Pichia guilliermondii* estimula o aumento de peróxido de hidrogénio e a deposição de lenhina em frutos de tomate cherry, diminuindo a susceptibilidade do fruto a patogénios, estando correlacionado com o aumento das actividades da PAL e a β -1,3-glucanase, ambas associadas a respostas de defesa do fruto (Zhao et al., 2009). O antagonista *Aureobasidium pullulans* também aumenta a actividade da β -1,3-glucanase, assim como da quitinase e da peroxidase (Ippolito et al., 2000), importantes nos mecanismos de defesas. A acumulação destas enzimas (β -1,3-glucanase e chitinase) em tecidos de maçã correlacionam com a resistência ao *B. cinerea* (El Ghaouth et al., 2003). Estes estudos mostram a capacidade dos antagonistas de induzirem mecanismos de defesa, através do aumento de enzimas ou compostos relacionados com o sistema antioxidante. Por outro lado, o uso de antagonistas poderá contribuir também para o reforço necessário para impedir a colonização do fungo e progresso da infecção, através de modificações na estrutura da parede celular, embora a informação existente sobre o assunto seja ainda escassa. O estudo do padrão genético assim como da actividade enzimática das enzimas modificadoras da parede poderá contribuir para um melhor entendimento destas alterações na parede celular, induzidas pela presença do antagonista. Na pêra 'Rocha', entender estas modificações é uma contribuição para a compreensão dos mecanismos envolvidos na interacção entre patogénio (*Penicillium expansum*), antagonista (*A. pullulans*) e o hospedeiro (*Pyrus communis*), tanto a nível molecular como bioquímico.

2. Objectivo

Este trabalho tem como objectivo contribuir para a avaliação da existência de um possível reforço da parede celular do hospedeiro (pêra 'Rocha'), após bio-tratamentos com o antagonista *Aureobasidium pullulans*, como mecanismo responsável por restringir a progressão da infecção por podridão azul, causada pelo fungo *Penicillium expansum*, e compreender os mecanismos ao nível bioquímico e molecular, de modo a elucidar as bases subjacentes ao biocontrolo. Para tal, foram

efectuados estudos de quantificação de expressão génica e de actividade enzimática em famílias de genes, que actuam sobre diferentes componentes da parede celular, usando como material frutos de pêra ‘Rocha’, quando em interacção com o fungo.

A medição da capacidade antioxidante total e dos compostos fenólicos (compostos com mais capacidade antioxidante no fruto) foi também efectuada como marcador de stress e com vista ao esclarecimento sobre o papel da defesa antioxidativa nos mecanismos gerais de defesa contra a patogenicidade e sobre o desenvolvimento de resistência à doença através da interacção antagonista.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal

Os frutos de pêra ‘Rocha’ utilizados nos ensaios foram colhidos num pomar em Alcobaça. Foram utilizados 100 frutos que foram conservados durante 2 meses, em câmaras frias da “Coopêrativa Agrícola do Cadaval - COOPVAL”, a temperaturas de - 0,5 a 0 °C e 95 % de humidade relativa, antes de ser usados nos ensaios no laboratório de Biologia Molecular do Agri4Safe/BioTrop do Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT).

3.2 Preparação dos meios de cultura e crescimento dos fungos

Pesou-se, num copo de precipitação, 39 g de Agar de batata dextrosada (PDA, Difco) aos quais se adicionou um litro de água destilada. Dividiu-se o meio para tubos de ensaio (15 ml/tubo) e esterilizou-se por autoclavagem a 1 atm, durante 15 minutos. Para plaquear, o meio esterilizado foi dissolvido num microondas e verteu-se o conteúdo de cada tubo para cada placa de Petri, deixando arrefecer posteriormente. Retirou-se 1 disco de 5 mm de diâmetro de uma placa inoculada com o *Aureobasidium pullulans*, com 7 dias de crescimento, e colocou-se no centro de uma nova placa de Petri. Para o *Penicillium expansum*, retirou-se, com uma ansa de inoculação, uma quantidade pequena de esporos, de uma placa previamente inoculada, com 7 dias de crescimento, e colocou-se no meio de uma nova placa de Petri. Após 7 dias, a 22 °C, foram utilizadas para a preparação dos inóculos.

3.3 Preparação dos inóculos

3.3.1 *Penicillium expansum*

Para preparar a suspensão de esporos, adicionou-se num frasco contendo 20 ml de H₂O, previamente esterilizado, uma gota de Tween-80 e esporos, retirados com uma ansa da placa de Petri, com 7 dias de incubação/crescimento, a 22°C (procedimento referido na alínea 3.2). A mistura foi agitada no vortex (Biosan) e procedeu-se à contagem dos mesmos, utilizando a câmara de Newbauer, ajustando-se a suspensão de esporos até se obter uma concentração final de 1x10⁴ UFC/mL.

3.3.2 *Aureobasidium pullulans*

Preparou-se 600 ml de meio caldo nutritivo dextrosado com extrato de levedura (NYDB) em que se pesou 1,6 g de caldo nutritivo (Merck), para um copo, e adicionou-se 1,0 g de extracto de levedura (Merck), 2,0 g de dextrose (Merck) e perfazendo o volume total com água destilada. A mistura foi dissolvida com aquecimento em microondas até ferver. Verteu-se o meio para balões Erlenmeyer (50ml/balão), cobriu-se com algodão e papel de alumínio e esterilizou-se por autoclavagem a 1 atm, durante 15 minutos. A cada Erlenmeyer adicionou-se 2 discos de 5 mm de diâmetro, retirados das placas de Petri com *A. pullulans* com 7 dias de incubação/crescimento, e incubou-se em banho-maria a 26°C, com agitação (72 U/min), durante 48 h. Em seguida, centrifugou-se a 5.000 rpm, durante 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet adicionando 10 mL de água destilada, previamente autoclavada, vortexou-se (Biosan) e filtrou-se com filtros estéreis para um frasco. Em seguida procedeu-se à contagem dos esporos, utilizando a câmara de Newbauer, e ajustou-se até se obter uma concentração final de 1x10⁸ Ufc/mL.

3.3.3 Contagem de esporos

A contagem dos esporos foi determinada num hemacitómetro, também designado por Câmara de Newbauer, e consiste numa lâmina de vidro com 4 mm de espessura, de dimensão 30 x 70 mm, com duas áreas independentes no centro. Cada área é dividida em 3 quadrantes (A, B e C), como ilustrado na Figura 3.1.

A quantificação dos esporos foi realizada através do seguinte cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Concentração / mL} &= \text{Total de células de 4 quadrados (Áreas A)} * 2,500 * \text{factor de diluição} \\ \text{Concentração / mL} &= \text{Total de células de 5 quadrados (Área C)} * 50.000 * \text{factor de diluição} \end{aligned}$$

A concentração dos esporos foi ajustada, quando necessário, com água destilada.

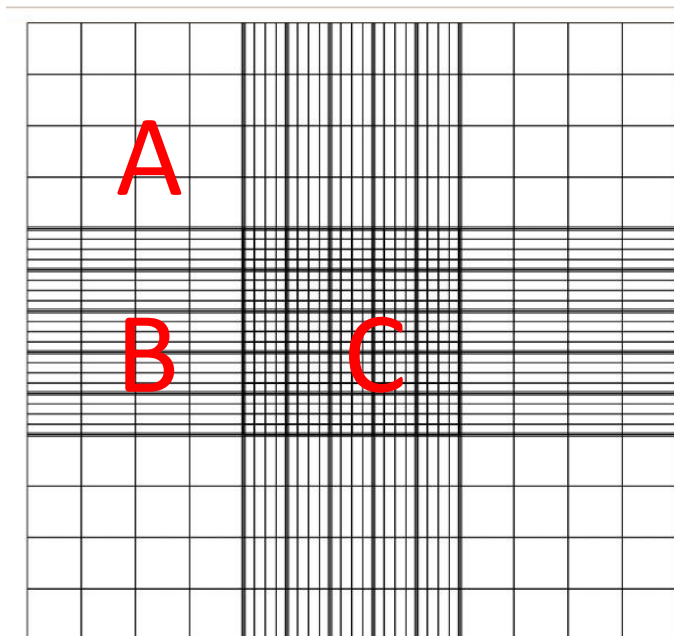


Figura 3.1 – Esquema da Câmara de Neubauer (Adaptado de http://www.microbehunter.com/wp/wp-content/uploads/2010/06/counting_chamber7.jpg)

3.4 Ensaios de biocontrole

As pêras foram desinfetadas com 0,5 % de uma solução de hipoclorito de sódio em água destilada durante 1 min. Inicialmente, as pêras foram divididas em 4 modalidades (25 pêras/modalidade). Em seguida, cada pêra foi ferida em 14 sítios, com uma agulha, e pulverizada com uma solução de inóculo contendo 1×10^8 UFC/mL de esporos de *Aureobasidium pullulans* ou apenas H₂O e, após 3 horas, com uma solução de inóculo contendo 1×10^4 UFC/mL de esporos de *Penicillium expansum* ou apenas H₂O, consoante cada modalidade:

- **H2O** - inoculadas com água destilada (controle);
- **Ap** - inoculadas com *A. pullulans* e posteriormente com água;
- **Pe** - inoculadas com água e posteriormente com *P. expansum*;
- **ApPe** – previamente inoculadas com o *A. pullulans* e em seguida com *P. expansum*.

Imediatamente antes de cada pulverização, o conteúdo foi misturado em vortex (Biosan) para uma melhor dispersão dos esporos. Todas as pêras foram colocadas em câmaras húmidas, de modo a proporcionar as condições propícias ao desenvolvimento dos fungos.

A amostragem foi realizada em 5 tempos (12h, 24h, 28h, 72h e 96h), após a última inoculação (Figura 3.2).

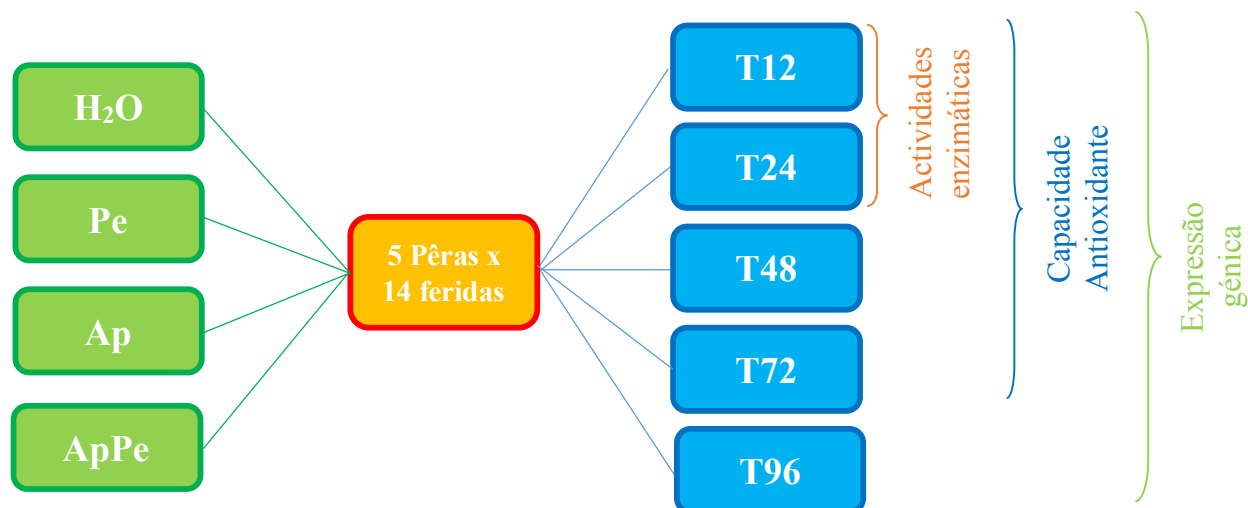


Figura 3.2 – Esquema da amostragem do ensaio de infecção das pêras.

3.5 Preparação das amostras para os diferentes ensaios

Para cada tempo, a massa de 20 pêras foi cortada, na zona onde foram feitas as feridas, imediatamente congelada em azoto líquido, tendo sido separado a massa relativa a 2 feridas das 20 pêras para posterior análise da expressão dos genes. Após a congelação as amostras foram moídas na presença de azoto líquido, com recurso a um moinho (IKA), colocada em tubos Falcon 50 ml e armazenada a -80 °C até ser analisada. Relativamente às amostras a ser utilizadas na expressão génica, após a congelação, foram moídas à mão num almofariz e usadas para extração de RNA.

3.6 Quantificação da capacidade antioxidante e compostos fenólicos

3.6.1 Preparação do extracto de pêra

A preparação de cada amostra, tratada de acordo com as modalidades descritas, foi realizada de acordo com Swain e Hills (1959). Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento. Pesou-se 1 g de amostra já moída e adicionou-se 4 mL de metanol (Sigma). Vortexou-se (Biosan)

durante 1 min e incubou-se a 4 °C, durante 24 horas. Centrifugou-se (Sigma 3K30) a 13.523 x g, durante 8 min, a 4 °C e filtrou-se o sobrenadante. O extracto foi armazenado a 4 °C, protegido da luz, até ser utilizado para a determinação do conteúdo em compostos fenólicos e antioxidantes.

3.6.2 Determinação da capacidade antioxidante pela captação do radical livre ABTS

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada de acordo com Miller e seus colaboradores (1993), com algumas adaptações. Juntou-se 0,3845 g de ABTS (Ácido 2,2`Azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico), Sigma) a 0,0662 g de persulfato de potássio (Sigma) e fez-se com 100 mL de água ultra pura, com agitação. Incubou-se a mistura por 16 horas protegida da luz, à temperatura ambiente. Em seguida a mistura foi diluída até se obter a absorvância a 734 nm de 0,7 (esperou-se 15 min antes de ler a absorvância). Num tubo Falcon 15 ml, juntou-se 3 mL de solução ABTS diluído a 60 µL do extracto de pêra. Foram feitas três réplicas técnicas por amostra. Após 6 minutos, a agitar, mediu-se a absorvância, num espectrofotometro UV2 (UNICAM UV/Vis), a 734 nm. Foi utilizado como padrão, ácido ascórbico (0 a 120 µg/ml) (Anexo A). Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido ascórbico por g.

3.6.3 Determinação da capacidade antioxidante total pelo método de DPPH

A determinação da capacidade antioxidante foi realizada de acordo com Brand-Williams e colaboradores (1995), com algumas adaptações. Pesou-se 0,0533 g de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil, Sigma) e adicionou-se 20 ml de metanol (Sigma). A mistura foi diluída até atingir uma absorvância, a 517 nm, inferior a 1. Num falcon 15 ml, juntou-se 300 µL de extracto de pêra a 5700 µL de DPPH diluído. Tendo sido feitas três réplicas técnicas por amostra. Incubou-se protegido da luz, à temperatura ambiente, durante 40 min e a absorvância foi medida a 517 nm, num espectrofotometro UV2 (UNICAM UV/Vis). Foi utilizado como padrão, trolox (0 a 250 µg/ml) (Anexo A). Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de trolox por g.

3.6.4 Determinação dos compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Swain e Hills (1959), com algumas adaptações. Num falcon 15 ml adicionou-se 4800 µL de água destilada, 300 µL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma) e 300 µL de extracto de pêra. Para cada amostra foram feitas três réplicas técnicas. Incubou-se durante 3 min e em seguida adicionou-se 600 µL de 10 % carbonato de cálcio (Sigma). Após incubar, protegido a luz durante 1 hora, à temperatura ambiente, mediu-se a

absorvância a 725 nm, num espectrofotómetro UV2 (UNICAM UV/Vis). Foi utilizado como padrão, ácido gálico (0 a 250 µg/ml) (Anexo A). Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico por g.

3.7 Determinação de actividades enzimáticas

3.7.1 Extracção das proteínas totais

Para cada modalidade, pesou-se 5g de cada uma de 3 réplicas biológicas de cada tratamento e adicionou-se 12mL de tampão de extração (200 mM fosfato de sódio pH 8.0; 5 mM EDTA, 5 mM DTT e 0,5 M cloreto de potássio) e 50 µL de PMSF (flureto fenilmetilsufonil, Sigma). O DTT, como é volátil, foi adicionado ao tampão de extração apenas na altura da sua utilização. Centrifugou-se a 20.000 x g, a 4 °C, durante 60 minutos e filtrou-se o sobrenadante para um novo falcon 50 ml. O tampão do extracto salino assim obtido foi trocado por tampões adequados às determinações de actividade enzimática a realizar, nomeadamente tampão 50 mM Acetato de sódio pH 4.5 ou 20 mM tampão Fosfato pH 6.0. O procedimento consistiu em passar 2,5 mL de amostra por colunas PD-10 (Ge Healthcare) equilibradas com os respectivos tampões, recolhendo a amostra em tampão para falcons 15 ml. (Figura 3.3).



Figura 3.3 – Aspecto do apparatus montado para a troca do tampão das amostras com colunas PD10.

3.7.2 Quantificação da proteína total extraída

Foi utilizado o método de Bradford. Este método consiste na utilização do Coomassie Brilliant

Blue G-250, que existe em duas formas diferentes, a forma azul e a vermelha. Antes de se ligar à proteína este encontra-se na forma vermelha, e ao ligar-se passa para à forma azul. Diferentes intensidades do azul correspondem a diferentes concentrações de proteína (Bradford, 1976).

Para a quantificação das amostras, adicionou-se 200 μL de uma solução comercial pré-preparada de um corante concentrado (BioRad, Sigma) a 200 μL de cada amostra a quantificar. Após incubação durante 7 min leu-se a absorvância, no espectrofotómetro UV2 (UNICAM UV/Vis), a 595 nm. A quantificação foi então realizada com recurso a curvas de calibração realizadas independentemente para cada tampão com diferentes concentrações de BSA (albumina de soro bovino, Sigma).

3.7.3 Determinação da actividade de Beta-galactosidase

A actividade enzimática da β -galactosidase foi realizada de acordo com Pressey (1983). A 80 μL de uma solução a 13 mM de p-nitrofenil-beta-D-galactopiranoside (Sigma) em tampão 50 mM Acetato de sódio pH 4.5, foi adicionado 200 μL de extracto proteico (também em tampão Acetato de sódio 50 mM pH 4.5, contendo cerca de 1 μg de proteína total). Incluiu-se uma amostra de proteína inactivada, em 20 % de SDS (Sigma), fervida durante 10 min e uma amostra de apenas tampão Acetato de sódio 50 mM pH 4.5. Para cada biológicas froma realizadas três replicas técnicas. Incubou-se a mistura a 37 °C, durante 15 e 30 min. Em seguida, adicionou-se 200 μL de solução 0,5 M de Na_2CO_3 (Sigma). A libertação de p-Nitrofenol glicosideo foi medida por leituras num espectrofotómetro a 415 nm. O p-Nitrofenol (Sigma) foi utilizado como padrão (Anexo A). Os resultados foram expressos em p-Nitrofenol μmol por min e μg .

3.7.4 Determinação da actividade de α -L-arabinofuranosidase

A actividade enzimática da α -L-arabinofuranosidase foi realizada de acordo com Pressey (1983). A 225 μL de uma solução a 13 mM de p-nitrofenil-alfa-L-arabinofuranosidase (Sigma) em tampão 50 mM Acetato de sódio pH 4.5 foi adicionado 150 μL de extracto proteico (também em tampão Acetato de sódio 50 mM pH 4.5, contendo cerca de 1 μg de proteína total). Incluiu-se uma amostra de proteína inactivada em fervura durante 10 min em 20 % de SDS (Sigma) e uma amostra de tampão Acetato de sódio 50 mM pH 4.5. Incubou-se a mistura a 37 °C, durante 30 e 60 min. Em seguida, adicionou-se 120 μL de solução 0,5 M de Na_2CO_3 (Sigma). Foram feitas três réplicas técnicas por amostra biológica. A libertação de p-Nitrofenol glicosideo foi medida no espectrofotómetro a 415 nm. O p-Nitrofenol (Sigma) foi utilizado como padrão (Anexo A). Os resultados foram expressos em p-Nitrofenol μmol por min e μg .

3.7.5 Determinação da actividade de Exo-poligalacturonase

A determinação da actividade enzimática da exo-poligalacturonase foi realizada de acordo com Gross (1982). A 200 μL de uma solução de 0,75 % (p/v) de ácido poligalacturónico (Sigma) preparada em tampão 50 mM Acetato de sódio pH 4,5 adicionou-se 200 μL de extracto proteico (também este dissolvido em tampão acetato de sódio, contendo 1 μg de proteína total em cada amostra). Incluiu-se uma amostra de proteína inactivada por fervura durante 10 minutos em 20 % de SDS (Sigma) e uma amostra de tampão Acetato de sódio 50 mM pH 4.5. Incubou-se a mistura em banho-maria (Unitronic Or, Selecta), a 30 °C, durante 2 e 4 horas, com agitação e adicionou-se em seguida 1,33 mL de 0,1 % (p/v) 2-cianoacetamida em tampão borato 0,1 M pH 9 frio. Misturou-se bem e ferveu-se a mistura durante 10 minutos. Deixou-se arrefecer até 25 °C. A formação dos açúcares redutores foi estimada através da medição da absorvância a 276 nm, no espectrofotómetro. O ácido galacturónico (Sigma) foi utilizado como padrão (Anexo A). Os resultados foram expressos em ácido galacturónico μmol por min e μg .

3.7.6 Determinação da actividade de Endo-poligalacturonase

A actividade enzimática da endo-poligalacturonase foi realizada por viscosimetria de acordo com Durbin e Lewis (1988). Inicialmente, preparou-se 25 mL de solução 5 % (p/v) de pectina com 90% de esterificação (Sigma) em tampão 50mM Acetato de sódio pH 4.5 (o mesmo da tampão da amostra). A mistura de reacção continha 333 μL da solução preparada e 200 μL de extracto proteico (1 μg de proteína total/amostra no mesmo tampão). Incluiu-se uma amostra de proteína inactivada em fervura durante 10 min em 20 % de SDS (Sigma) e uma amostra de tampão Acetato de sódio 50 mM pH 4.5. A alteração de viscosidade foi determinada através da medição do tempo que levou a mistura a movimentar-se entre as marcas 0,1 a 0,04 ml, numa pipeta de vidro de 0,1 ml posicionada verticalmente (Figura 3.4). Três réplicas técnicas foram medidas para cada uma das 3 réplicas biológica com um cronómetro. As misturas foram incubadas durante 3 e 6 horas, a 37°C, com agitação, medindo após cada tempo a viscosidade das reacções como descrito. Os resultados foram expressos em % de redução de viscosidade por hora.



Figura 3.4 – Aparatus usado: Pipeta de vidro de 0,1 ml utilizada na medição da viscosidade das amostras.

3.7.7 Determinação da actividade de Pectina metilesterase

A actividade enzimática da pectina metilesterase foi realizada de acordo com Hagerman e Austin (1986). A 900 μL de uma solução de 0,2 % de pectina de citrus (Sigma) em água destilada, contendo 0.002 % de bromotimol azul (Sigma) e 100 mM de cloreto de sódio (Sigma) ajustada a pH 7.5 com NaOH, foi adicionado a 100 μL de extracto proteico (também este em água destilada, contendo cerca de 10 μg de proteína total). Incluiu-se uma amostra de proteína inactivada por fervura durante 10 min em 20 % de SDS (Sigma). Incubou-se a mistura à temperatura ambiente, durante 15 e 30 min. A produção de ácido foi medida por leituras no espectrofotómetro a 616 nm. A diminuição do pH da amostra é dada pela variação na A_{616} e expressa em /min. μg .

3.7.8 Determinação da actividade de 1,4-beta-endoglucanases

A actividade enzimática da 1,4-beta-endoglucanases foi realizada de acordo com Durbin e Lewis (1988). Inicialmente, preparou-se 25 mL de solução 1.5 % (p/v) carboximetilcelulose (CMC, viscosidade média - Sigma) em tampão Fosfato 20 mM pH 6.0. A mistura de reacção continha 700 μL da solução preparada e 200 μL de extracto proteico (1 μg de proteína total/amostra no mesmo

tampão). Incluiu-se uma amostra de proteína inactivada em fervura durante 10 min em 20 % de SDS (Sigma) e uma amostra de tampão Fosfato 20 mM pH 6.0. Foram feitas três réplicas técnicas por amostra biológica. A diferença de viscosidade relativamente ao tempo inicial foi determinada às 3 e 6 horas, de acordo com o procedimento descrito para a endo-poligalacturonase.

3.8 Quantificação da expressão génica de membros candidatos de famílias que actuam na parede celular

3.8.1 Preparação das amostras

Como já referido no ponto 3.5, a massa relativa a 2 feridas/pêra (total de 20 pêras por cada tratamento) foram recolhidas 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação, congeladas imediatamente em azoto líquido e armazenadas a -80 °C até serem analisadas. Aquando da análise, cerca de 40 amostras/tratamento foram maceradas à mão, utilizando um almofariz e pilão gelados tratados previamente com RNase AWAY®, para falcons 15 ml. Para cada amostra, foram pesados (Mettler® AE240) 500 mg de macerado para um eppendorf de 2 mL, previamente pesado e arrefecido com azoto líquido. As amostras foram posteriormente guardadas em azoto líquido, até o início do processo de extração de RNA.

3.8.2 Extração de RNA

A extração de RNA das amostras de pêra foi realizada utilizando o Mini Kit RNasey Plant (Qiagen) de acordo com as especificações do fabricante, com algumas modificações (protocolo completo no Anexo B) de modo a maximizar o rendimento da extração.

3.8.3 Electroforese em gel de Agarose para avaliação da integridade do RNA

Com o objectivo de visualizar a integridade do RNA extraído, as amostras foram separadas em gel de 1,5 % agarose. Inicialmente, adicionou-se 50 mL de 1xTAE a 0,75 g de agarose (Invitrogen®) para atingir a concentração de 1,5% de agarose. Após se dissolver no micro-ondas e deixar arrefecer até 50°C, adicionou-se 3 µL de corante Greensafe Premium (Nzytech®). A mistura foi vertida numa tina de electroforese, tendo sido previamente colocados os pentes, deixando a polimerizar durante cerca de 30 min.

Na tina de electroforese (Clever® ScientificLtd), após a polimerização, foi adicionado ao primeiro poço 0,3 µg de marcador molecular de 100 pb (Bioron®) e aos restantes, 2 µL de corante

Runsafe (Clever®) e 4 µL de cada amostra de RNA, previamente misturados com uma micropipeta. O gel foi coberto com tampão TAE e aplicou-se uma corrente de 80 V e 300 mA durante 30 min. No fim da electroforese, o gel foi exposto a luz ultravioleta.

3.8.4 Avaliação da pureza e concentração do RNA extraído

Para avaliação da pureza do RNA extraído, de modo a verificar a presença ou não de DNA contaminante, procedeu-se a amplificação das amostras por PCR convencional. Preparou-se uma mistura de reacção: 8,25 µL de água destilada, 1,25 µL de tampão 10x concentrado (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,25 µL de 2 mM dNTPs, 0,625 µL de primer forward de *ELF* a 20 µM e 0,625 µL de primer reverse de *ELF* (Tabela 2) a 20 µM e 0,5 µL de Taq DNA polimerase. A mistura é transferida para um microtubo e adiciona-se 0,5 µL de amostra de RNA purificado. A amplificação foi realizada num termociclador (Analytikjena®), seguindo-se o programa de amplificação: 3 min a 95° C, 35 x (30 s a 95° C, 30 s a 60° C, 45 s a 72° C) e 7 min a 72° C. Como controlo, o RNA foi substituído por amostra de DNA (controlo positivo) ou por água destilada purificada (controlo negativo). Os produtos da amplificação foram posteriormente corridos em gel de agarose como descrito no ponto 3.8.2.

As amostras que ainda continham DNA contaminante visível procedeu-se à purificação deste, através do kit Rapidout DNA Removal (Thermo Scientific) de acordo com as especificações do fabricante.

Após purificação, a concentração total de RNA foi verificada num leitor de microplacas (Synergy HT, Biotek, Germany), utilizando o software Gen5, de modo a garantir a mesma quantidade de amostra na síntese de cDNA.

Para determinar a pureza do RNA e DNA, calculou-se a razão entre a absorvância a 260 nm e 280 nm. Ao obter-se uma razão perto de 2.0 o RNA é considerado como tendo pureza suficiente para as aplicações posteriores. Para o DNA, a razão é de aproximadamente 1,8. A concentração do RNA e DNA foi determinada pelas seguintes formulas: $[RNA] = A_{260} \times 80 \times 40$ (µg/ml); $[DNA] = A_{260} \times 80 \times 50$ (µg/ml). A ausência de contaminantes de glúcidos e fenóis foi obtida através da formula: A_{260}/A_{230} ($\approx 2,0-2,2$).

3.8.5 Síntese de DNA complementar a partir do RNA total

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o Kit M-MLV RT (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Preparou-se uma mistura de reacção de 500 µg/ml Oligo dT e de 10mM dNTP's e adicionou-se a amostra (RNA); incubou-se a 65° C, durante 5 min e posteriormente durante

1 min no gelo; seguidamente adicionou-se 5xBuffer (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl e 15mM MgCl₂), 0,1 M DTT e 40 uni/μl RNase OUT e incubou-se novamente a 37°C, durante 2 min; Adicionou-se 200 unidades de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT); e a síntese do cDNA prosseguiu num termociclador programado com as seguintes condições: 25°C, 10 min; 37°C, 50 min; 70°C, 15 min. Em seguida as amostras de cDNA foram testadas através de uma reacção de PCR convencional usando primers para o gene *ELF* (ver em baixo) para determinar o sucesso da síntese do cDNA.

3.8.6 Desenho dos primers

As sequências nucleotídicas de cada um dos genes de interesse, assim como dos genes de referência (ACT, UBQ, GAPDH e ELF), foram obtidas através de pesquisas na base de dados no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os números de acesso encontram-se na tabela 2. Todos os primers foram desenhados usando o software Primer3 (Rozen, 2012) nas seguintes condições: O comprimento dos primers foi definido para se situar entre 20 e 23 pb, com um teor de GC entre 45 % e 60 % e uma temperatura de fusão (valor T_m) entre 62 ° C e 65 ° C . O comprimento do produto de amplificação esperado foi definido para ser entre 80 e 120 pb. A probabilidade dos primers se emparelharem com eles próprios ou entre primers do mesmo par foi avaliada com recurso ao algoritmo OligoCalc (ver. 3.26) (Kibbe, 2007).

Tabela 2 - Primers utilizados no estudo da expressão genética das amostras.

Gene	Nº Acesso	Primers	Espécie	Referência
Actina (ACT)	AF386514.1	For: 5- CCA TTT TAG CGT CCC TCA GC -3 Rev: 5- GCG CGA TTA GAA GCA TTT CC -3	<i>Pyrus communis</i>	-
Ubiquitina (UBQ)	AF386524	For: 5-GGC CAA GAT CCA AGA CAA GG -3 Ver: 5- GTT GTAG GTC GGC GAG GGT TC -3	<i>Pyrus communis</i>	-
Gliceraldeído 3-Fosfato desidrogenase (GAPDH)	AB266449.1	For: 5- CCC TTC ATC ACC ACC GAC TAC - 3 Rev: 5- TTG CCT TCT GAC TCC TCC TTG -3	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Bantog et al., 2006
Factor de alongamento (ELF)	AY338249	For: 5- TGT GGT CAT TGG TCA TGT CG -3 Rev: 5- CTT GTC TGA GGG CCT CTT GG -3	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Faize et al., 2004

Beta-galactosidase (B-Gal)	AJ811694.1	For: 5- GGA AAG TCC CCG CTT CTT AC - 3 Rev: 5- GAT TCT CCA ACG ACC CAT AG -3	<i>Pyrus communis</i>	Fonseca et al., 2005
Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH1)	AB095368.1	For: 5- TTG CTG TGT TTG GTC TCT GC - 3 Rev: 5-TGT GAT CAA AAG CCC AAG TG -3	<i>Pyrus communis</i>	Hiwasa et al., 2002
Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH2)	AB095369.1	For: 5- ATA CGG GGC AAA GAA TGG AG -3 Rev: ACG GAT CAA ACC AGA GAT TG -3	<i>Pyrus communis</i>	Hiwasa et al., 2002
Poligalacturonase (PG1)	AB084461.1	For: 5- TGA TAG GGT GTC CGG CTA CC-3 Rev: 5-TTC TTG GCC TGATCA ATT CC -3	<i>Pyrus communis</i>	Hiwasa et al., 2003
Poligalacturonase (PG2)	AB084462.1	For: 5- ATT GGA AAT GCC GGT AAC TG -3 Rev: 5- GAC TTG CAA TCC CAC AAT CC -3	<i>Pyrus communis</i>	Hiwasa et al., 2003
Expansina (EXP 1)	AJ811691.1	For: 5- ACC CTG TCG TTT CGA GTC AC -3 Rev: 5- ACC CTG TCG TTT CGA GTC AC -3	<i>Pyrus communis</i>	Fonseca et al., 2005
Expansina (EXP 2)	AJ811692.1	For: 5- GAT GGT GCA ATC CTC CTC TC -3 Rev: TCT GAA GGA AAC CTG GCA CT -3	<i>Pyrus communis</i>	Fonseca et al., 2005
Endo-1,4-β-glucanase 2 (Cell2)	AB067645.1	For: 5- TGG GGA TCA GAT GAA GTT TGG -3 Rev: 5- AAC TGA TTC ACC GCA TCC ATC -3	<i>Pyrus communis</i>	Sekine et al., 2006
Pectina metilesterase 1 (PME1)	AB067681.1	For: 5- AAC GCG GGA GAT AAG AGG TTC -3 Rev: 5- TCT CCC AAG AAC ACC ACG TTC -3	<i>Pyrus communis</i>	Sekine et al., 2006

3.8.7 Cálculo da Eficiência de amplificação dos primers

A eficiência de cada par de primers foi quantificada através da aplicação de séries de diferentes concentrações de cDNA de pêra (150, 30, 6 e 1,2 ng). A mistura de reacção, preparada em 15 µl consistiu em: 1,5 µl de cada primer (3 µmol) Fwr e Rev, 7,5 µl de SyberGreen, e 3,9 µl de água destilada. Para cada primer usou-se 3 replicações técnicas. A 14,4 µl da mistura de reacção foram adicionados 0,6 µl de amostra de cDNA e cada uma das concentrações sequenciais. Em seguida a amplificação decorreu de acordo com as seguintes condições: 95°C, 30s; 40 ciclos de 95°C, 5s e 60°C,

30 s. Para verificar a especificidade de cada amplificação e ausência da formação de dímeros dos primers, foram obtidas curvas de dissociação para cada amplificação no fim das corridas de PCR, através da continuação da medição por fluorescência de 55°C a 95°C (0,5°C por 15s). Em todos os casos foi obtidos apenas um pico. Não foram detectados sinais de amplificação nos controlos (tendo sido utilizado DNA ou RNA em vez do cDNA sintetizado) executados em paralelo com cada conjunto de primers.

Com base na recta da curva padrão produzida relacionando o log da quantidade inicial em ng com o Ct (“Cycle Threshold”, número mínimo de ciclos para a amplificação ser detectada) calculou-se a eficiência dos primers utilizando a fórmula: $E (\%) = (10^{- (1 / \text{declive})} - 1) \times 100$, onde E é a eficiência, em percentagem, e o declive é a inclinação da recta de melhor ajustamento.

3.8.8 Quantificação da expressão de genes candidatos com papel de modificação da parede celular por PCR quantitativo em tempo real (PCR real time)

A análise da expressão dos genes de interesse foi realizada utilizando o equipamento qTower 2.2 (Analytik Jena) e o software qPCR Soft 1.1 (Figura 3.5). Inicialmente fez-se a diluição das amostras de cDNA para que todas estivessem na mesma concentração (150 ng/μl). A mistura de reacção consistiu em: 1,5 μl de cada primer (3 μmol) Fwr e Rev, 7,5 μl de SyberGreen e 3,9 μl de água destilada. Para cada gene foram usadas 3 réplicas biológicas de cada amostra, e realizadas 2 replicações técnicas. Ao volume reaccional de 14,4 μl foi adicionado a cada poço da placa (cada placa contem 96 poços no total), 0,6 μl de cDNA (150 ng) de cDNA de cada uma das amostras. A placa foi selada, com selante adesivo transparente (Microseal®), e colocada no equipamento, sendo as amostras amplificadas de acordo com o seguinte programa: 95 °C, 4 min; 40 x (95 °C, 5s e 60 °C, 5s).

Após a amplificação, os Ct's (cycle threshold – ciclo limiar) obtidos das diferentes amostras foram introduzidos numa folha de cálculo, tendo sido calculado as médias e os desvios padrões para cada gene. Em seguida, quantificou-se a expressão relativa dos diferentes genes, normalizada por 4 genes de referência (ACT, UBQ, GAPDH e ELF), com o recurso às seguintes fórmulas, descritas por Vandesompele e colaboradores (2002): $\Delta Ct = \text{menor Ct} - Ct \text{ de cada amostra}$; $Ef = (10^{- (1 / \text{declive})} - 1)$; $\text{Expressão normalizada} = (Ef^{\Delta Ct} \text{ Gene de interesse}) / (\text{Média geométrica } [Ef^{\Delta Ct} \text{ Genes de referência}])$; $\text{Erro padrão} = (\sqrt{GInorm \times [(\frac{SDNF}{NF})^2 + (\frac{SDGI}{GI})^2]}) / \sqrt{m}$. GInorm é a normalização da expressão relativa dos genes de interesse, DPFN é o desvio padrão do factor de normalização, NF é o factor de normalização, SDGI corresponde ao desvio padrão das quantidades do gene de interesse, GI ao cálculo da quantidade do gene de interesse (=Ef^{ΔCt}) e m é o número de réplicas.

Os valores obtidos da expressão relativa normalizados foram transformados através de

log2 relativamente às amostras do controlo (tratamento apenas com H2O).



Figura 3.5 - Equipamento qTower 2.2 e o software qPCR Soft 1.1, utilizados no PCR quantitativo em tempo real.

3.9 Análise Estatística

Para avaliar se existiam diferenças significativas entre tratamentos, aplicou-se o teste ANOVA ($P \leq 0,05$), e em seguida o teste de Tukey para determinar quais os tratamentos que diferiram significativamente. Para ambos os testes recorreu-se ao programa Statistix 9.

4. Resultados e Discussão

Este trabalho decorreu no âmbito dos objectivos do projecto “SafeFruit - *Aureobasidium pullulans*, um biofungicida para o controlo de patogenias na pós-colheita de pêras: compreensão dos mecanismos de acção”, cujo objetivo final é aumentar a eficácia do controlo biológico, obtendo formulações comerciais do antagonista que possam ser aplicadas eficazmente, em pré e em pós colheita. Especificamente, pretendeu-se complementar o conhecimento sobre os mecanismos biológicos e moleculares de acção do antagonista, que é ainda incipiente, visando aqui fundamentalmente uma investigação mais aprofundada sobre os mecanismos envolvidos na defesa por parte do hospedeiro, no caso particular da pêra 'Rocha', quando em contacto com o antagonista. Para tal, recorreu-se ao estudo de modificações no sistema antioxidante e da estrutura da parede celular em tecidos inoculados com o *A. pullulans* e *P. expansum* que visa compreender o seu possível contributo na acção de biocontrolo deste antagonista na pêra.

4.1 Efeito das inoculações controladas na sanidade das pêras

A inoculação controlada com os diferentes microorganismos, isoladamente ou em combinação, produziu efeitos distintos no hospedeiro, permitindo comprovar a eficiência do *A. pullulans* como potencial agente de biocontrolo e obter amostras biológicas para os ensaios laboratoriais que procuraram investigar a base molecular subjacente. A figura 4.1 ilustra a evolução ou não evolução de lesões resultantes dos diferentes tratamentos 72 horas após cada inoculação. Os resultados indicam que apenas no tratamento com *P. expansum* (Figura 4.1F), 3 dias após a inoculação, a infecção foi capaz de progredir, o que é evidenciado pela presença de zonas mais acastanhadas, com um contorno circular regular, típicas da inoculação com este fungo patogénico. O efeito individual da inoculação com *A. pullulans* mostrou não resultar em infecção nos frutos testados (Figura 4.1G), sendo os efeitos produzidos semelhantes ao controlo, para o mesmo tempo (Figura 4.1E). Quando a inoculação de *P. expansum* foi efectuada após pré-inoculação com o agente antagonista, não se observaram também sinais de progressão da infecção, sendo possível observar a presença do fungo patogénico confinado ao interior da ferida (Figura 4.1H). As figuras 1A-D ilustram o aspecto das pêras no tempo 0 de cada inoculação.

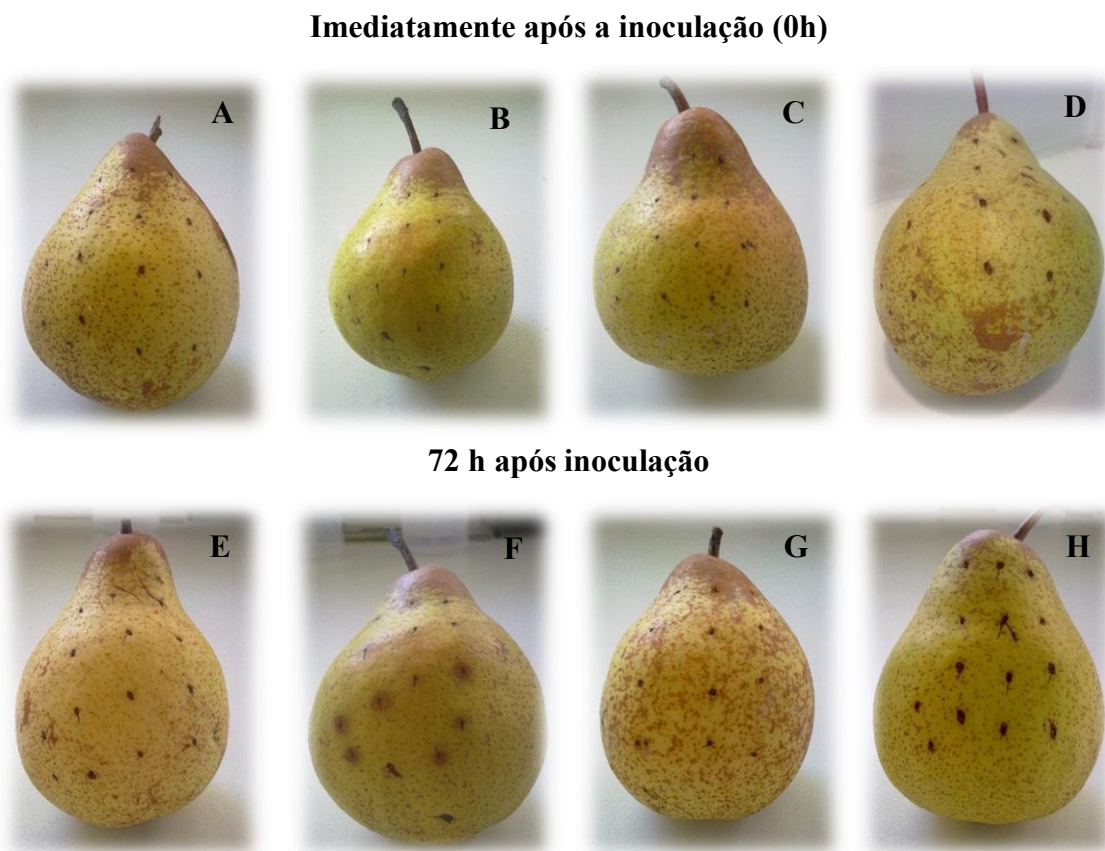


Figura 4.1 – Aspecto dos resultados das inoculações em pêras ‘Rocha’ em resposta aos diferentes tratamentos, após 0 e 72 horas de inoculação. Aspecto ilustrativo de pêras, às 0 horas após a inoculação, quando inoculadas com: (A) água destilada (controlo); (B) *P. expansum*; (C) *A. pullulans*; (D) *A. pullulans* e *P. expansum*. Aspecto da pêra, às 72 horas após

a inoculação, quando inoculadas com: (E) água destilada; (F) *P. expansum*; (G) *A. pullulans*; (H) *A. pullulans* e *P. expansum*.

Estes resultados que mostram um efeito inibidor da infecção por *P. expansum* na presença de *A. pullulans* são a base do trabalho desta dissertação e estão de acordo com as observações reportadas por Marques (2012) e Lara e Barreiro (2012), em que, usando os mesmos microorganismos mas sob diferentes procedimentos de inoculação, foi observado um avanço da doença em pêras inoculadas apenas com *P. expansum*, 4 e 6 dias após o tratamento, em cada trabalho, respectivamente. No entanto, no presente ensaio, as lesões produzidas observadas visualmente foram qualitativamente de menor diâmetro, diferença que se deve ao procedimento experimental utilizado que difere do aplicado nestes (Marques, 2012; Lara e Barreiro, 2012) e noutros trabalhos (por ex. Lidon et al., 2012, Borges et al., 2004, Ferreira et al., 2008). De facto, no presente trabalho, os ferimentos foram feitos utilizando uma agulha, o que difere do método de formação de feridas de 4 mm de diâmetro utilizado nestes trabalhos. Por outro lado, as pêras foram aqui pulverizadas em toda a sua superfície com suspensões de fungos em contraste com a inoculação especificamente no local da ferida através da aplicação de soluções líquidas contendo os esporos. Assim sendo, o diâmetro dos pontos de inoculação e a quantidade de esporos do inóculo foram, neste estudo, menores, observando-se assim as correspondentes lesões com diâmetro visivelmente menores às obtidas nas outras condições publicadas. O mesmo motivo explica que nem todos os ferimentos tenham apresentado sinais da doença, possivelmente porque o patogénio não entrou em contacto com todas as feridas. Este modo de inoculação reflecte melhor o que se passa em condições naturais onde nem todas as lesões sofridas pelos frutos são colonizadas e as lesões são usualmente muito pequenas. Por outro lado, esta estratégia facilitou a obtenção de material vegetal para estudos bioquímicos e moleculares.

4.2 Resposta da capacidade antioxidante e compostos fenólicos aos tratamentos impostos

O poder antioxidante das pêras Rocha foi medido às 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação, nos diferentes tratamentos em análise, pelos métodos Ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), e o conteúdo em compostos fenólicos, pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos apresentam-se nas Figuras 4.2.1-4.2.3. Estes ensaios tiveram como objectivo investigar possíveis associações entre o grau de resistência manifestado pela pêra Rocha em resposta à inoculação com *A. pullulans*, com mecanismos de resposta ao stress oxidativo, como contribuição para o mecanismo de biocontrolo contra a infecção causada pelo fungo da espécie *P. expansum*.

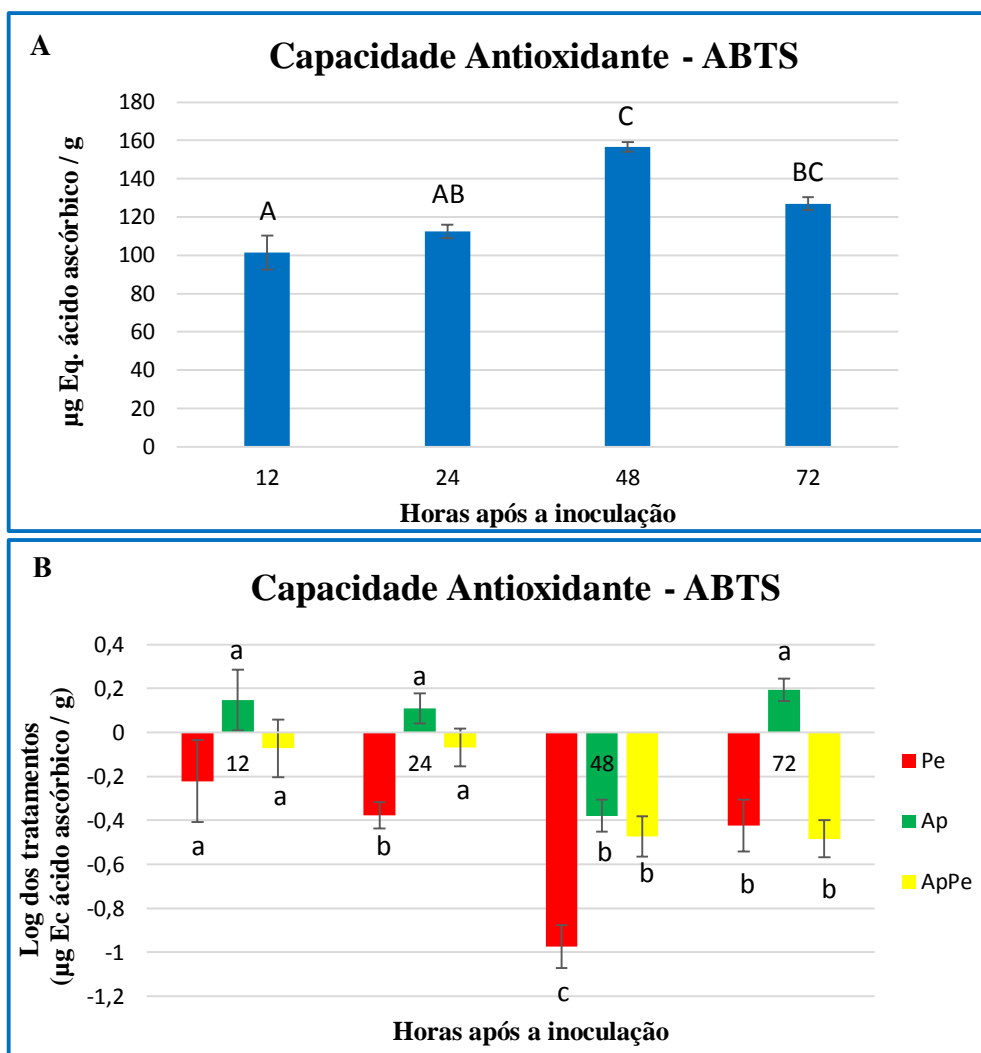


Figura 4.2.1 – Resultados da quantificação da actividade antioxidante em pêras Rocha, pelo método de ABTS, às 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. A: Evolução em pêras não inoculadas com organismos patogénicos (controlo); B: Variação em pêras após os tratamentos, relativamente aos níveis nas amostras controlo. Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As barras representam os valores médios e as barras correspondem a \pm erro padrão. As letras A, B e C indicam diferenças estatisticamente significativas entre tempos de amostragem e as letras a, b e c indicam diferenças significativas entre tratamentos, em cada tempo, ambos a $P < 0,05$.

A figura 4.2.1A, referente à actividade antioxidante determinada pelo método de ABTS, mostra que em condições controlo houve um aumento de eq. de ácido ascórbico, após 48 horas após a inoculação, o que sugere um aumento de capacidade antioxidante possivelmente em resposta a um aumento do stress oxidativo, causado pelos fermentos provocados nos frutos. A correlação positiva entre fermento e stress oxidativo foi observada por Castoria e seus colaboradores (2003) em maçãs.

Na figura 4.2.1B, referente à variação da capacidade antioxidante nos tratamentos em relação aos valores quantificados em amostras controlo, os resultados mostram que às 48 horas após a

inoculação, houve uma diminuição estatisticamente significativa de eq. de ácido ascórbico nas pêras inoculadas com *P. expansum*, em contraste com os tratamentos em que foi usado o antagonista (Ap e ApPe). Estes resultados são semelhantes aos de Lidon e os seus colaboradores (2012b) que observaram, também em pêras Rocha, uma diminuição de ácido ascórbico deste nos tecidos inoculados com o patogénico em contraste com os tratamentos com o antagonista (individualmente ou combinado), no mesmo tempo do presente estudo, sugerindo uma interacção entre o caminho ascorbato-glutationa e a acção fungistática da *A. pullulans*, em resposta ao stress biótico. Embora a capacidade antioxidante total seja o resultado da acção de vários compostos, os resultados publicados quanto às concentrações de ácido ascórbico são ilustrativos das diferenças no poder antioxidante que resulta dos diferentes tratamentos e suporta os resultados obtidos.

Na figura 4.2.2 são apresentados os resultados referentes à presença de compostos com actividade antioxidante, desta vez quantificados pelo método de DPPH.

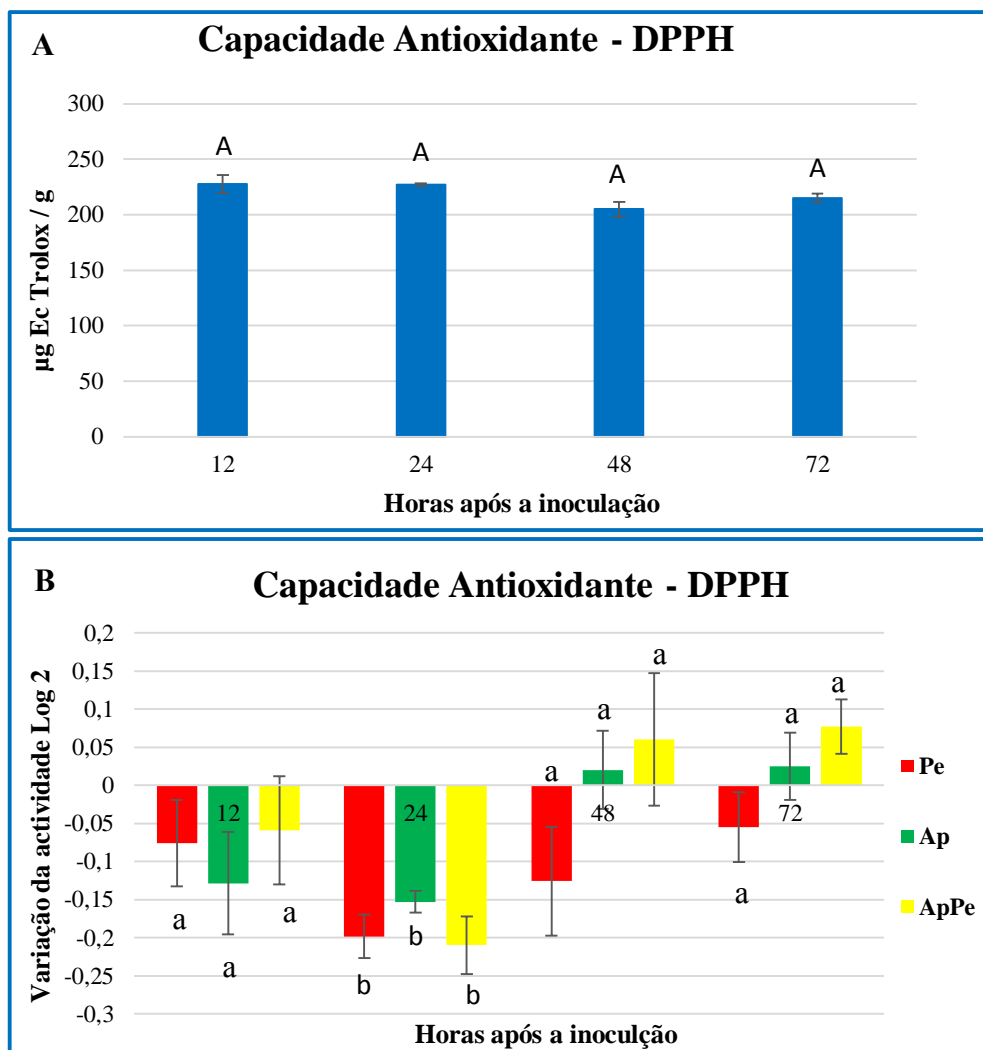


Figura 4.2.2 – Resultados da quantificação da actividade antioxidante em pêras Rocha, pelo método de DPPH, às 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. A: Evolução em pêras não inoculadas com organismos patogénicos (controlo); B: Variação

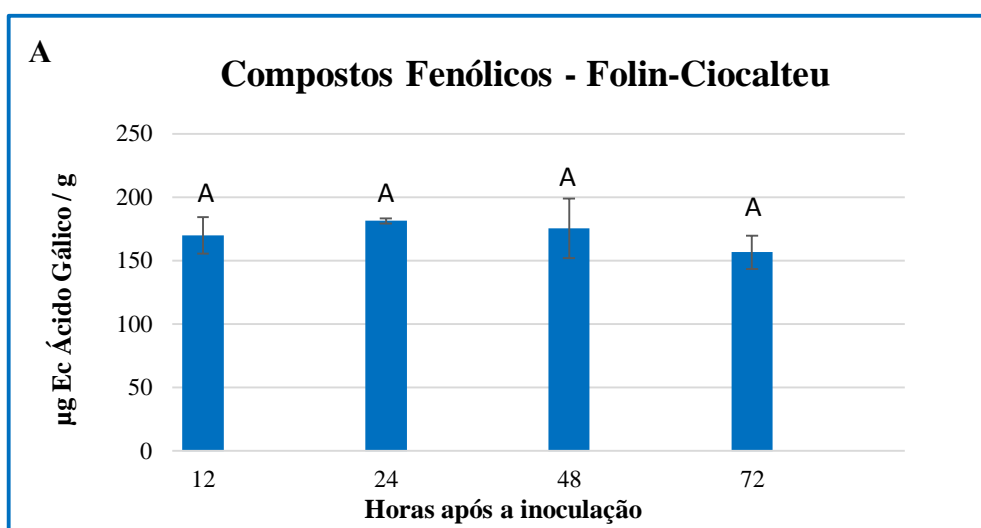
em pêras após os tratamentos, relativamente aos níveis nas amostras controlo. Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As barras representam os valores médios e as barras correspondem a \pm erro padrão. As letras A, B e C indicam diferenças estatisticamente significativas entre tempos de amostragem e as letras a, b e c indicam diferenças significativas entre tratamentos, em cada tempo, ambos a $P < 0,05$.

Segundo este método, os resultados obtidos usando pêras em condições controlo e expostos na figura 4.2.2A, não revelaram diferenças na capacidade antioxidante resultante dos compostos medidos por este método, mantendo-se estatisticamente inalterada pelo período de tempo em estudo, o que indica que provavelmente não houve uma resposta da pêra ao fermento em termos de antioxidantes, causado pelo stress oxidativo associado a esta condição (associação que foi observada por Castoria e seus colaboradores (2003)).

Analisando a figura 4.2.2B, observaram-se diferenças estatisticamente significativas apenas 24 horas após a inoculação, traduzidas numa diminuição significativa da capacidade antioxidante nos tecidos inoculados independentemente da espécie de fungo ou do seu efeito sinérgico (Pe, Ap e ApPe) em todos os tratamentos relativamente às amostras controlo, o que sugere uma reação geral por parte das pêras à presença dos fungos.

As diferenças observadas entre os resultados obtidos através do método ABTS e DPPH, poderão dever-se ao radical livre que estes métodos reconhecem.

O conteúdo em compostos fenólicos produzidos pelas pêras em resultado dos ensaios foi quantificado pelo método de Folin-Ciocalteu, e os resultados estão reflectidos no gráfico da Figura 4.2.3.



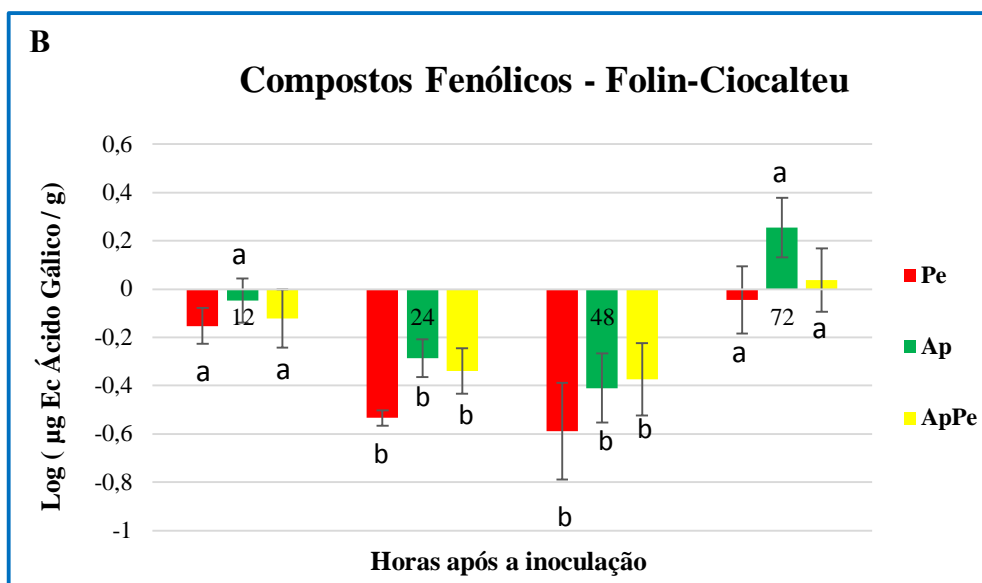


Figura 4.2.3 – Resultados da quantificação da actividade antioxidante em pêras Rocha, pelo método de Folin-Ciocalteu, às 12, 24, 48 e 72 h após a inoculação. A: Evolução em pêras não inoculadas com organismos patogénicos (controlo); B: Variação em pêras após os tratamentos, relativamente aos níveis nas amostras controlo. Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As barras representam os valores médios e as barras correspondem a \pm erro padrão. As letras A, B e C indicam diferenças estatisticamente significativas entre tempos de amostragem e as letras a, b e c indicam diferenças significativas entre tratamentos, em cada tempo, ambos a $P < 0,05$.

Na figura 4.2.3A, relativamente à quantificação dos compostos fenólicos em pêras em condições controlo, os resultados mostram que não houve uma evolução na quantidade de compostos fenólicos quantificáveis produzidos ao longo da maturação ou em resposta a ferimentos. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Bordbar e seus colaboradores (2010), tendo estes reportado não haver diferenças significativas ao longo do tempo em maçãs (neste trabalho os compostos fenólicos foram analisados com um intervalo de 2 dias). Por outro lado, Chen e seus colaboradores (2009) observaram uma acumulação de diferentes compostos fenólicos na banana; correlação também observada por Tosetti e seus colaboradores (2014), em pêsegos ‘Glohaven’, tendo observado um pico destes compostos 8 horas após o ferimento, mantendo-se o nível constante no restante período (até 3 dias após o ferimento). No entanto, esta resposta mostrou ser dependente do material usado já que os mesmos autores observaram também uma diminuição dos compostos fenólicos noutra variedade de pêsegos ‘BigTop’. Uma possível justificação para as respostas observadas prende-se com diferentes estados de maturação dos pêsegos (Tosetti et al., 2014). Ou serem o resultado de diferentes respostas dependentes do tecido ao ferimento (Reyes et al., 2007). Neste contexto, os resultados sugerem que não foram activados processos metabólicos de produção de compostos fenólicos com o ferimento nos tecidos da pêra de acordo com o sugerido noutros trabalhos como Reyes et al., 2007.

Analisando a figura 4.2.3B, os resultados obtidos em resposta aos diferentes tratamentos mostram que houve uma diminuição significativa nas diferentes modalidades, 24 e 48 horas após a inoculação, mas mostrou ser independente do tratamento, sugerindo que a presença dos microrganismos contribuiu para uma alteração significativa na produção de compostos fenólicos relativamente ao que acontece no controlo. Contrariamente, foram observados em maçãs tratadas com *P. expansum* e com o antagonista *Trichoderma virens*, a ausência de diferenças significativas nos tratamentos com o antagonista (individualmente ou combinado), 2 e 4 dias após a inoculação (Bordbar et al., 2010). Por outro lado, foi reportado por Bordbar e seus colaboradores (2010), e por Schovánková e Opatová (2011), um aumento dos compostos fenólicos das maçãs controlo para as tratadas com *P. expansum*, resultados contrários ao obtido neste estudo em que houve uma diminuição do controlo para os tratamentos. É de referir que os resultados obtidos por Schovánková e Opatová (2011) foram medidos 7 dias após a inoculação e por Bordbar e seus colaboradores (2010), após 2 e 4 dias de inoculação, condições que são diferentes das realizadas neste ensaio dado que os compostos fenólicos foram medidos até aos 3 dias de inoculação. Para além de que as interações fruto-patogénio poderão ser diferentes, dado que no presente ensaio foram utilizadas pêras. Neste contexto, os resultados sugerem que a presença dos microrganismos induz uma diminuição da presença de compostos fenólicos o que poderá significar que a infecção fúngica inibe a sua acumulação, para permitir a progressão da infecção. Esta inibição é contudo revertida após 72h, excepto no caso dos compostos detectados pelo método de ABTS (Fig. 4.2.1B). Neste caso, a presença de *P. expansum* continua a inibir a acumulação de compostos antioxidantes, enquanto a colonização por *A. pullulans* não conduz a diferenças relativamente ao controlo. Esta observação sugere um efeito mais pronunciado por parte do patogénico, que não consegue ser revertido pelo antagonista, quando em combinação.

Analisando de forma conjunta os vários resultados obtidos pelos diferentes métodos, observou-se um padrão global de diminuição significativa nas três modalidades em simultâneo, 24 e 48 horas após a inoculação (DPPH e ABTS, respectivamente). Este padrão verificou-se em ambos os tempos no que diz respeito aos compostos fenólicos, o que poderá reflectir a porção destes detectada através dos métodos de ABTS e DPPH em cada um dos tempos. Globalmente, há que referir que, através da técnica de ABTS às 24h e 48h, o efeito de inibição da produção de compostos ligados à defesa surge mais cedo (às 24h) em amostras inoculadas apenas com o patogénico, sendo às 48h menor em amostras inoculadas com o antagonista, isoladamente e em combinação, sugerindo uma explicação para a contribuição no fenómeno de biocontrolo. Relativamente ao antagonismo, diversos autores mostraram que a aplicação de agentes de biocontrolo induzem a acumulação de enzimas antioxidantes ou de compostos fenólicos. Exemplos incluem, em maçã, a presença do antagonista *Trichoderma virens* em tecidos inoculados com *P. expansum* (Bordbar et al., 2010) ou mesmo de *A.*

pullulans em tecidos inoculados tanto com *B. cinerea* ou *P. expansum* (Ippolito et al., 2000). No entanto, o mesmo não foi observado nas condições do presente trabalho.

Considerando que estes compostos podem ser consumidos no processo de lenhificação em vias metabólicas provenientes da PAL, pode ser sugerido um mecanismo em que a redução generalizada destes compostos significará um reforço da estrutura da parede celular através do aumento da produção de lenhina (Baxter e Stewart Jr, 2013). Os compostos medidos pelo método de ABTS revelam que, dada a maior agressividade, esta lenhificação começa mais cedo nas amostras inoculadas com o agente patogénico, estendendo-se a todas as condições, 48h após as inoculações. Nas 24h seguintes, apenas as duas amostras com agente patogénico ainda consomem estes compostos antioxidantes, o que sugere que a lenhificação não é necessária quando o hospedeiro está em contacto apenas com o antagonista.

4.3 Resposta da actividade de enzimas modificadoras da parede celular na pêra Rocha

Recorreu-se à quantificação das actividades totais de várias enzimas responsáveis por alterações estruturais da parede celular, com o intuito de investigar se houve um reforço ou alteração desta em resposta à inoculação com *A. pullulans* funcionando como uma componente do modo de mecanismo de biocontrolo contra a infecção por parte de fungos da espécie *P. expansum*. De notar que, tendo sido quantificadas actividades enzimáticas totais, não foi possível distinguir a fracção produzida pela planta da fracção produzida pelo patogénico, nos casos em que enzimas da mesma família são produzidas por ambos os organismos.

Em todos os casos, as medições de actividade foram efectuadas após 2 tempos de reacção, servindo o último para garantir que, no 1º momento, o substrato não havia ainda sido totalmente consumido e a reacção atingido a fase estacionária. Os resultados mostram que, em todos os ensaios, a actividade medida no tempo 2 foi sempre significativamente superior à actividade medida no tempo 1 (Anexo C).

4.3.1 β -Galactosidase

Na figura 4.3.1 estão expostos os resultados referentes à actividade enzimática da β -galactosidase (β -Gal, EC 3.2.1.23).

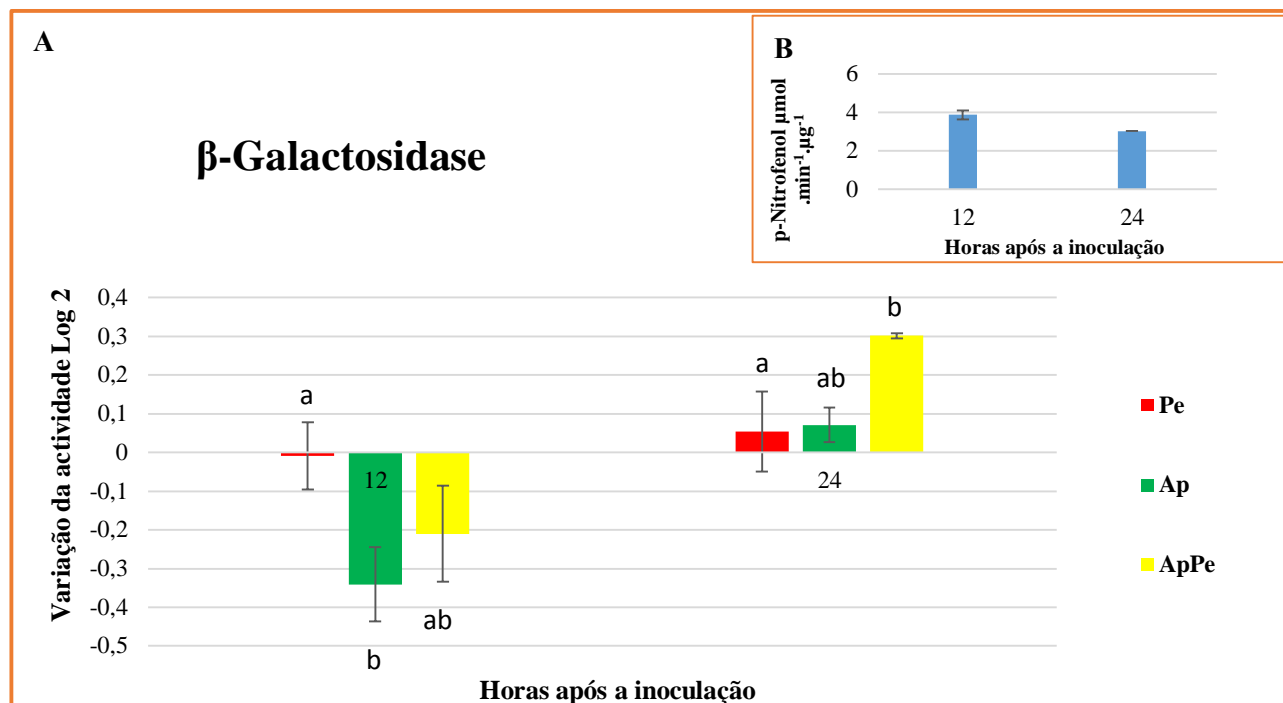


Figura 4.3.1- A) Resultados da actividade enzimática da β -Galactosidase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$.

Na figura 4.3.1A, referente aos resultados da variação da actividade β -galactosidase nos diferentes tratamentos em relação às pêras controlo (Figura 4.3.1B), observaram-se diferenças estatísticas nos dois tempos, 12 e 24 horas após a inoculação, traduzidos numa diminuição da actividade da β -Gal no tratamento com *A. pullulans* e um aumento de actividade no tratamento em que ambos os fungos foram inoculados, respectivamente. O papel desta família de enzimas em tecidos inoculados com *B. cinerea* em frutos de tomate em maturação foi anteriormente reportada por Shah e seus colaboradores (2012), sugerindo que o patógeno poderá usar estas enzimas para facilitar a quebra da parede celular dos frutos durante a infecção. Assim, a redução na actividade verificada 12h após inoculação sugere que a actividade medida não reflecte a acção das enzimas produzidas pelos fungos. Dado que a acção destas enzimas, quando produzidas pela planta, é reflectida nas taxas de

solubilização e despolimerização das pectinas, através das modificações que induz nas ramificações das suas cadeias (Goulao, 2005) resultando na perda de grandes quantidades de galactose, característica associada às alterações de textura que ocorrem durante a maturação do fruto em diversas espécies: maçã, melão, tomate (Cantu et al., 2007). A diminuição da actividade da β -Gal, 12 horas após a inoculação, provavelmente induzida pelo antagonista, poderá significar um reforço da parede celular da pêra. Por outro lado, o seu aumento às 24h no tratamento em que o antagonista precede a inoculação com o patogénico, poderá ser indicativo de uma maior libertação de resíduos de galactose em resposta à sinergia entre fungos, servindo como sinalização e funcionando como parte das respostas de biocontrolo, seguindo uma via paralela, igualmente conhecida (Morkunas e Ratajczak, 2014).

4.3.2 α -L-Arabinofuranosidase

A figura 4.3.2 representa os resultados obtidos na determinação da actividade da α -L-arabinofuranosidase (AFase; EC 3.2.1.55).

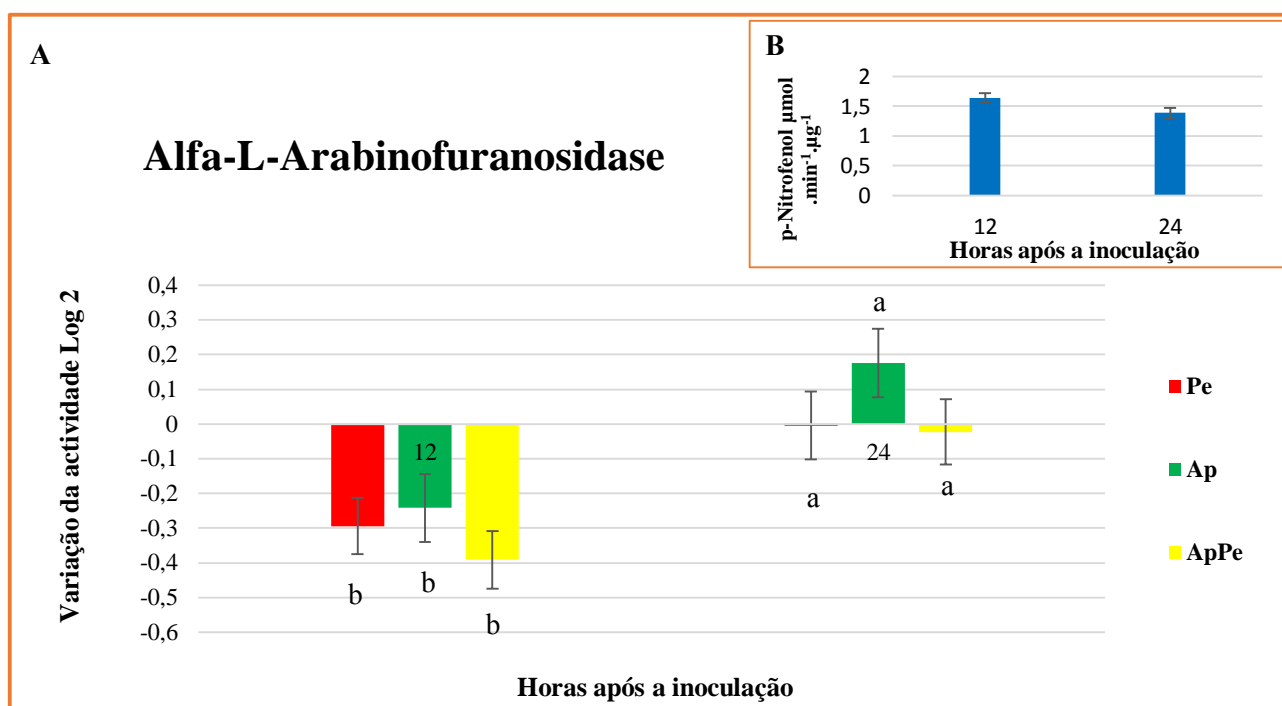


Figura 4.3.2 – A) Resultados da actividade enzimática da α -L-arabinofuranosidase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$.

Na figura 4.3.2A, podemos observar os valores medidos da actividade desta família em resposta às diferentes modalidades ensaiadas. Os resultados obtidos mostram que após 12 horas da inoculação foi observada uma diminuição significativa da actividade da α -L-arabinofuranosidase nas pêras inoculadas em todos os tratamentos (com os fungos *P. expansum* e *A. pullulans*, separadamente ou em combinação) relativamente ao controlo (figura 4.3.2B). Os resultados obtidos sugerem que haverá uma diminuição da acção da enzima, nas primeiras 12 horas de tratamento, numa tentativa de diminuição da degradação da parede, como meio geral de defesa a infecções. A correlação positiva entre o amolecimento da fruta (o que reflecte degradação e solubilização de componentes da parede celular (Goulao e Oliveira, 2008) e que aumenta a susceptibilidade aos patógenos) e actividade da enzima foi reportado por Tateishi e seus colaboradores (2005) em pêras Japonesas e por Goulao e seus colaboradores (2007) em maçãs, durante o processo de maturação. Neste contexto, os resultados observados sugerem uma diminuição da solubilização e despolimerização das pectinas desencadeado por este mecanismo, significando que houve uma reacção rápida da pêra como uma tentativa de reforço na presença dos microorganismos, sem distinguir a sua espécie. Após este primeiro período de resposta rápida, os níveis retomam aqueles do controlo, significando que não há envolvimento desta actividade enzimática no processo posterior de biocontrolo.

4.3.3 Exo e Endo-Poligalacturonase

Os resultados referentes as actividades de exo- e endo-poligalacturonases (exo-PG, EC 3.2.1.67; e endo-PG, EC 3.2.1.15) encontram-se ilustrados nas figuras 4.3.3.1 e 4.3.3.2.

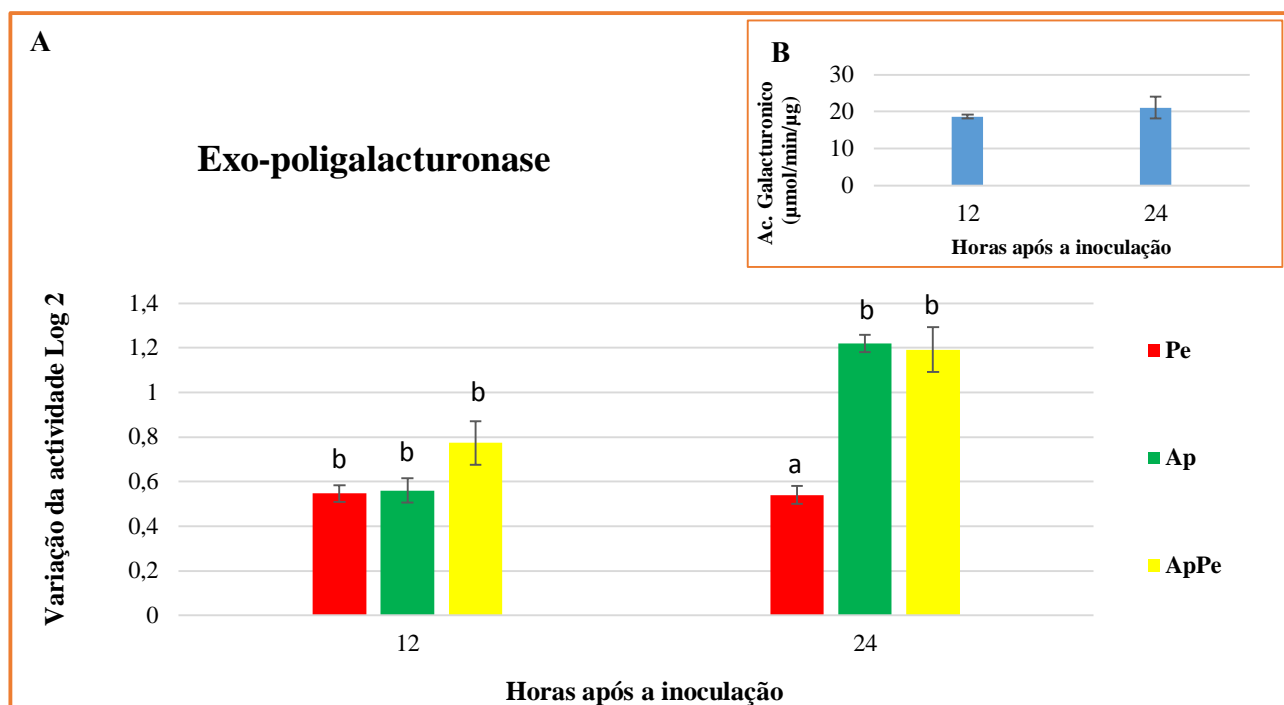


Figura 4.3.3.1 - A) Resultados da actividade enzimática da Exo-poligalacturonase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$.

Na figura 4.3.3.1A, referente aos resultados da actividade da exo-poligalacturonase, observa-se que existiu um aumento desta nos diferentes tratamentos (Pe, Ap e ApPe), 12 horas após a inoculação, que se manteve às 24 h de ensaio, mas apenas em amostras na presença do antagonista (Ap e ApPe). Miedes e Lorences (2006) reportaram um aumento desta enzima em maçãs e tomates inoculados com o *P. expansum*, 3 dias após a inoculação, quando comparadas aos frutos controlo, sugerindo que a infecção induz a activação destas enzimas no hospedeiro. No presente trabalho, observou-se um aumento nos tempos iniciais da infecção, o que sugere uma resposta rápida da pêra ao fungo no início do processo. Focando o antagonismo, o aumento da actividade da exo-PG nos tratamentos onde existiu a presença de *A. pullulans* sugere que poderá ter havido uma produção acentuada destas enzimas pelo próprio antagonista, de modo a induzir na pêra mecanismos de defesa contra o patógeno. Uma vez que a libertação de monossacáridos terminais das pectinas pelas exo-PG poderá levar a activação de sinais em cascata induzindo respostas de defesa no hospedeiro, o aumento destas enzimas irá contribuir para uma reposta de defesa mais rápida por parte do hospedeiro contra infecção, num fenómeno semelhante ao discutido para as β -Gal. A hipótese desta actividade resultar de enzimas produzidas pelos fungos no processo de colonização das células do hospedeiro é questionada, uma vez que a presença de *A. pullulans* acentua os níveis de actividade enzimática 24 h

após inoculação, relativamente ao Pe.

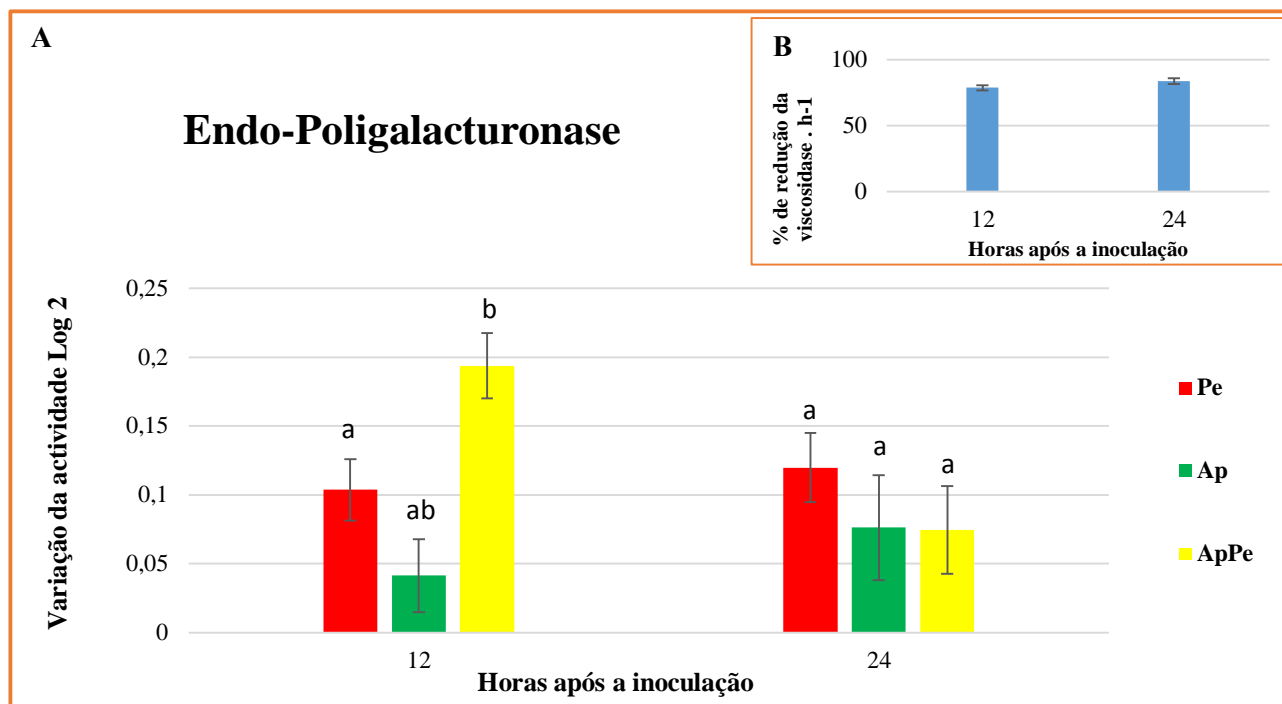


Figura 4.3.3.2 - A) Resultados da actividade enzimática da Endo-poligalacturonase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e as letras a e b indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$.

Analisando a figura 4.3.3.2A, referente aos valores medidos em resposta às diferentes modalidades ensaiadas, em contraste com o controlo (Figura 4.3.3.2B), observou-se um aumento da actividade da endo-poligalacturonase (endo-PG), no tratamento em que ambos os fungos foram inoculados num efeito de sinergia, 12 horas após a inoculação. Dado que as poligalacturonases têm um efeito de promoção da despolimerização e solubilização das pectinas e estão associadas ao amolecimento da fruta (Goulao e Oliveira, 2008), estado que propicia a susceptibilidade da fruta a patogénios, a acção destas enzimas poderão ser importantes factores de patogenicidade contribuindo para a colonização do patogénio (Gomathi e Gnanamanickam, 2004). Por exemplo, foi demonstrado em pêras e em maçãs um aumento de actividade de poligalacturonases produzidas por *P. expansum* aquando da invasão e colonização (Jurick et al., 2010; Yao et al., 1996). Por outro lado, em maçãs e tomates inoculados com a mesma espécie de fungo, foi observado por Miedes e Lorences (2006) um aumento significativo da actividade da endo-PG, 3 dias após a inoculação, que os autores atribuíram a uma resposta por parte do hospedeiro, levando a alterações na sua parede celular. Foi também

observado por Powell e seus colaboradores (2000), em tomates transgênicos que expressavam a proteína inibidora da poligalacturonase da pêra, uma diminuição do crescimento do *B. cinerea*. Neste contexto, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem um aumento na despolimerização das pectinas no primeiro tempo investigado em amostras em condições de bio-controlo. Este fenómeno requer identificação da origem das PGs para poder ser discutido com mais detalhe.

4.3.4 Pectina metilesterase

Na figura 4.3.4 encontram-se representados os resultados obtidos na determinação da actividade da pectina metilesterase (PME).

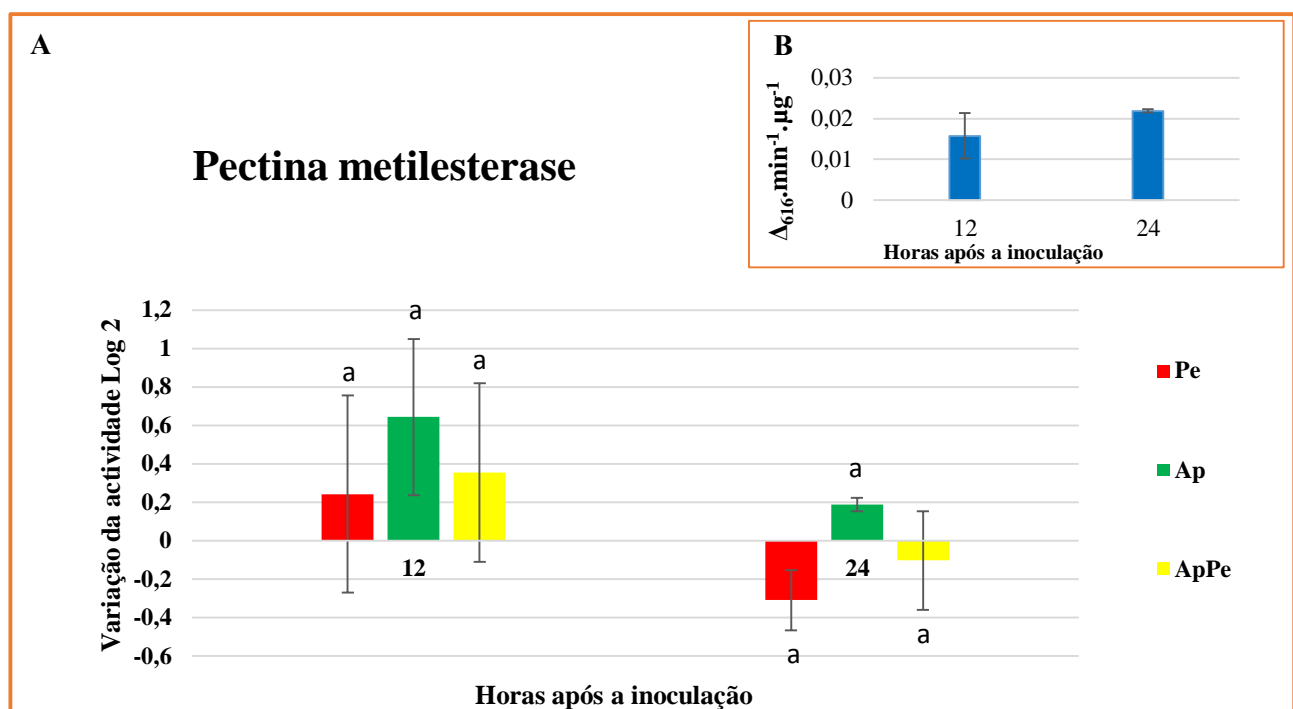


Figura 4.3.4 - A) Resultados da actividade enzimática da Pectina metilesterase em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e a letra a indica que não houve diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$.

Analisando a figura 4.3.4A, referente à actividade enzimática da pectina metilesterase, não foram observadas diferenças nos diferentes tratamentos. Os resultados sugerem que não houve uma resposta, por parte do hospedeiro, na actividade da enzima à presença dos fungos. A ausência de diferenças foi também observado por Miedes e Lorences (2006), em tomate infectados pelo *P.*

expansum em contraste com tomates controlo, 3 dias após a inoculação. No entanto, o mesmo grupo também observou um aumento na actividade da PME em maçãs inoculadas com o mesmo patogénio face ao controlo, no mesmo tempo de inoculação. Resultados que os autores justificam como consequência de diferentes interações patogénio-hospedeiro (Miedes e Lorences, 2006), específicas para a espécie de hospedeiro.

4.3.5 Endo-1,4- β -glucanase

Os resultados obtidos quanto à determinação da actividade de endo-1,4- β -glucanases estão representados na figura 4.3.5.

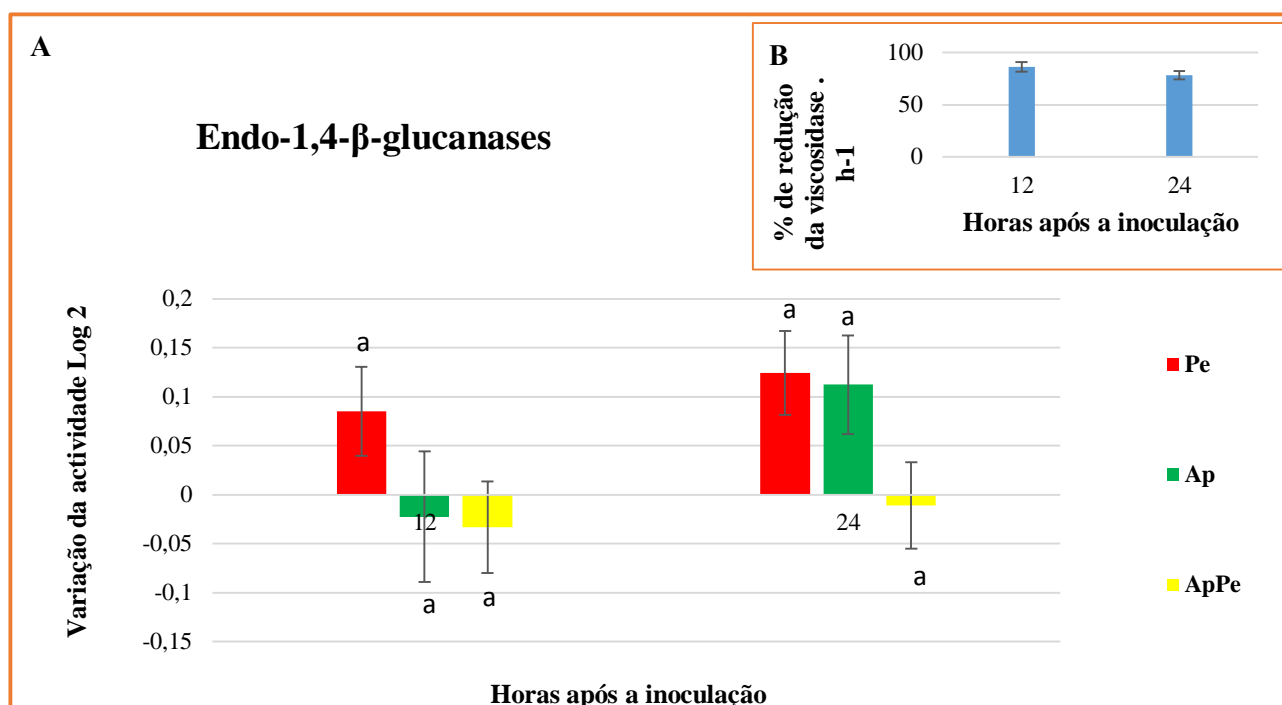


Figura 4.3.5 - A) Resultados da actividade enzimática da Endo-1,4- β -glucanases em extractos proteicos de pêra Rocha, 12 e 24 h após a inoculação com Pe, *P. expansum*; Ap, *A. pullulans*; e ApPe, sequencialmente com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*; B) Resultados quantificados em pêras controlo nos mesmos tempos. Para cada tempo, as barras representam a média das observações \pm erro padrão e a letra a indica que não houve diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$.

Na figura 4.3.5A, nos vários tratamentos, não foram observadas diferenças estatísticas. Os resultados sugerem que a actividade resultante desta família de enzimas não tem envolvimento no fenómeno biológico investigado. Não deverá ser descartada a hipótese do envolvimento desta família de enzimas na actividade total, em tempos de infecção mais longos no sistema investigado neste

trabalho, como mecanismo de resposta mais tardio. De facto, Real e seus colaboradores (2004) observaram uma redução da acumulação da proteína, em frutos de tomate, 4 dias após a inoculação com *P. expansum* ou com *B. cinerea*, sugerindo que a actividade da enzima poderia fornecer nutrientes ao patógeno e facilitar a entrada do fungo nos tecidos do hospedeiro, e que, por sua vez, a diminuição da sua actividade contribuiria para que a parede celular se mantivesse intacta por um maior período de tempo. Por outro lado, em folhas de tomateiro, transformado com genes antisense para as isoformas da EGase, *Cell* e *Cel2*, e inoculadas com *B. cinerea*, foi observado por Flors e seus colaboradores (2007) uma acumulação de calose (açúcar que se deposita na parede celular aquando da infecção por fungos e vírus) na zona de infecção, 72 horas após esta. Segundo os autores, estes resultados podem dever-se ao facto da calose ser um possível substracto da EGase e a ausência de actividade hidrolítica desta enzima servir de sinal para a célula de uma alteração da estrutura e função da parede, activando mecanismos de defesa (Flors et al., 2007).

4.4 Expressão génica de membros de famílias que codificam enzimas modificadoras da parede celular na pêra Rocha

Com o objectivo de investigar se houve uma alteração na transcrição de genes que possa justificar um reforço da parede celular em resposta a *A. pullulans* como modo de mecanismos de biocontrolo contra a infecção por parte de fungos da espécie *P. expansum*, recorreu-se à quantificação da expressão de alguns genes que codificam membros de famílias de enzimas da pêra, com papel conhecido e importante na modificação da parede celular. Embora a significância estatística tenha sido avaliada em todos os tempos para todas as condições, apenas se considera variação de expressão de genes com relevância biológica quando a variação da expressão relativa em log₂ mostra uma magnitude superior a 2.

4.4.1 β -Galactosidase

O padrão de expressão da β -galactosidase (β -Gal) em pêras controlo e a sua variação em pêras inoculadas com os fungos relativamente ao controlo é apresentado, respectivamente, nas figuras 4.4.1.1 e 4.4.1.2.

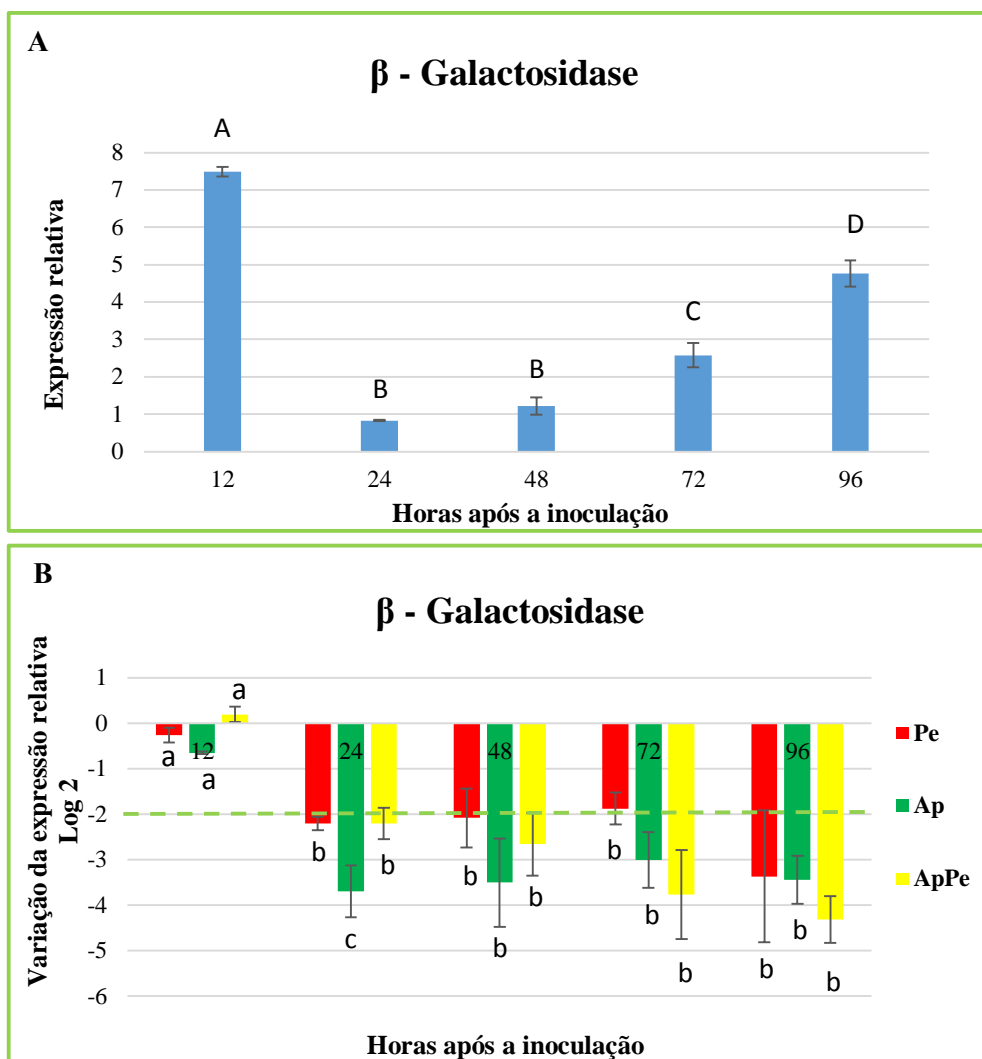


Figura 4.4.1 - Resultados da expressão génica de um membro das β -galactosidas em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B, C e D) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos, dentro de cada tempo $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Analisando a figura 4.4.1A, observou-se uma diminuição significativa da expressão do gene da β -Gal (AJ811694.1; Fonseca et al., 2005), 24 horas após o fermento. Os resultados mostram que a expressão deste gene foi mais elevada 12h após o início do ensaio, sugerindo dever-se à resposta rápida ao fermento de agulha usado nos processos de inoculação. Segundo Wu e Burns (2004), factores ambientais, como fermentos, podem induzir a expressão da β -galactosidase. Estes aumentos foram também sugeridos indirectamente por Karakurt e Huber (2002), uma vez que a actividade da enzima aumentou em papaias, 24 horas após fermento. A evolução entre as 24 – 96h está de acordo

com o aumento de β -Gal associado à maturação (Fonseca et al., 2005; Goulão et al., 2008).

Na figura 4.4.1B, referente à expressão deste gene nos diferentes tratamentos, observou-se uma diminuição da sua expressão, a partir das 24 horas após a inoculação, em todos os tecidos inoculados com os fungos (individualmente ou combinados). Tal revela uma repressão da expressão deste gene na parede celular da pêra, provavelmente devido a um mecanismo de resposta para defesa da pêra face a presença dos fungos, no sentido de minimizar a solubilização e despolimerização das pectinas, reforçando a estrutura da parede celular (Fonseca et al., 2005). Esta hipótese é suportada pela repressão ainda mais significativa nas amostras inoculadas com o agente antagonista, no primeiro tempo em que se observou o efeito.

4.4.2 Poligalacturonase

Nas figuras 4.4.2.1 e 4.4.2.2 estão representadas o padrão de expressão de 2 membros diferentes de genes da família de poligalacturonases (PG1 e PG2).

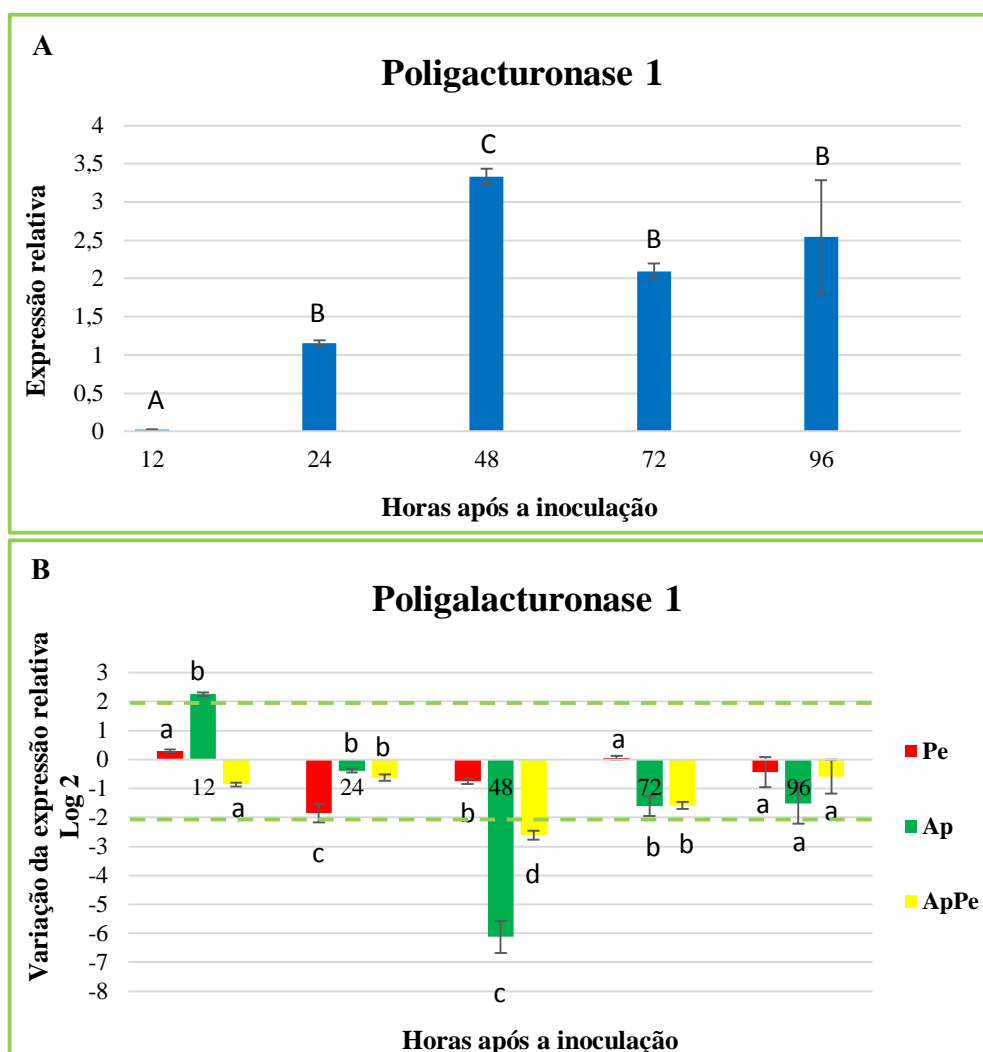
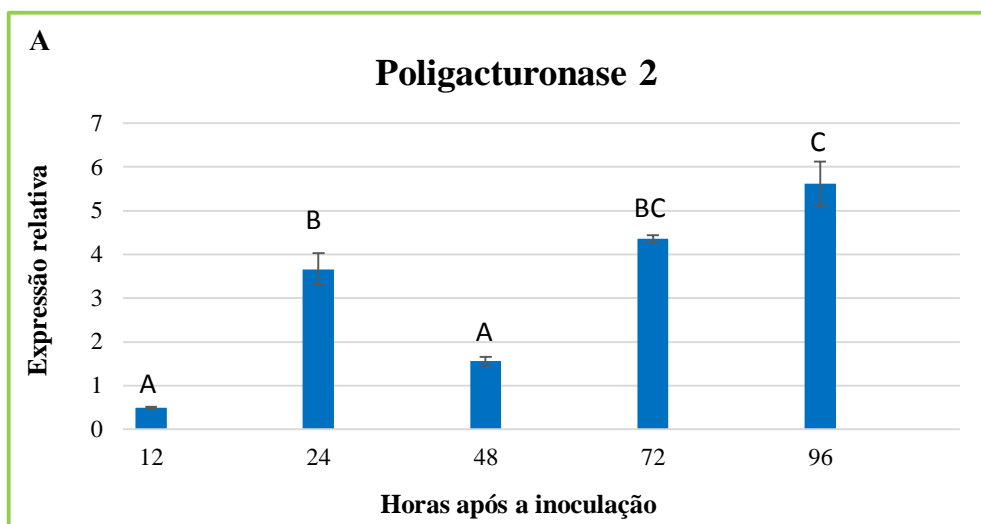


Figura 4.4.2.1 - Resultados da expressão da poligalacturonase 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação.

A) pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Na expressão da poligalacturonase 1 (AB084461.1; Hiwasa et al., 2003) em pêras em condições controlo (Figura 4.4.2.1A), observou-se um aumento da expressão entre as 24 e as 96h após a inoculação, com um pico às 48h. Estes resultados poderão ser explicados pelo processo de maturação (Fonseca et al., 2005; Goulao et al., 2008).

Genes de *PG* codificam enzimas que promovem a solubilização e a despolimerização das pectinas. Por exemplo, a supressão da *PGI* em tomate e morango induz uma redução na solubilização da pectina, que pode ser acompanhado por aumentos na firmeza da fruta em algumas espécies (revisado por Goulao et al., 2010). Na figura 4.4.2.1B, relativamente ao padrão de expressão do gene *PGI*, salienta-se a significativa inibição da expressão 48h após as inoculações, em ambas as amostras com a presença do antagonista (Ap e ApPe). Assumindo que este gene codifica uma isoforma de PG, estes resultados sugerem uma resposta de defesa da pêra quando exposta aos fungos, resultando em níveis mais baixos da isoforma PG1 e, conseqüentemente, de uma diminuição da despolimerização e solubilização promovida pela poligalacturonase, reforçando a parede celular do hospedeiro.



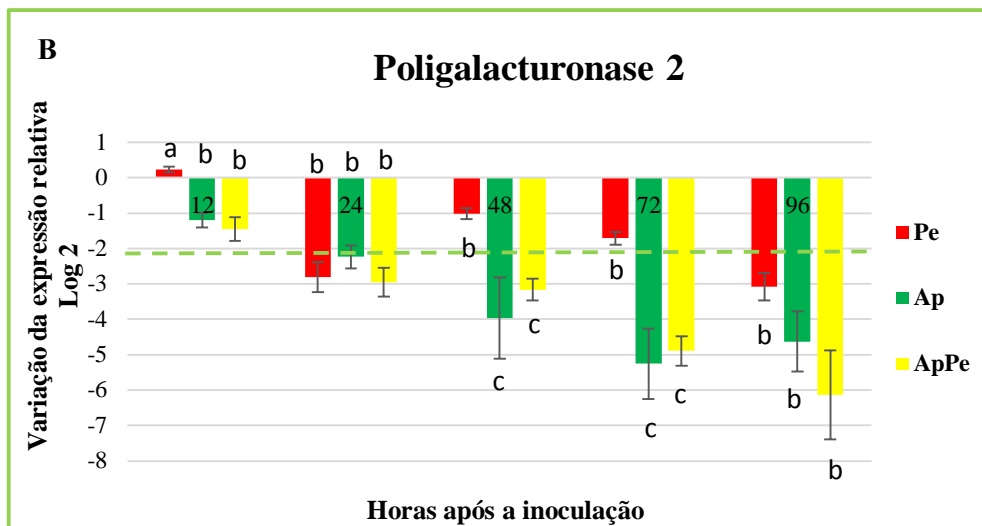


Figura 4.4.2.2 - Resultados da expressão da poligalacturonase 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Na figura 4.4.2.2A, estão representados os valores obtidos na expressão do gene da poligalacturonase 2 (AB084462.1; Hiwasa et al., 2003), em pêras controlo, onde se observou um aumento da expressão após a inoculação. Resultados que poderão ser explicados pelo processo de maturação (Fonseca et al., 2005; Goulão et al., 2008;).

Analisando a figura 4.4.2.2B, observou-se uma diminuição da expressão do gene da poligalacturonase 2, 48h e 72 h após infecção em amostras onde existia o agente antagonista (Ap e ApPe). Tal como discutido para *PGI*, este resultado sugere um reforço da parede celular em resultado de preservação da estrutura das pectinas. No entanto, neste caso o efeito do Ap perde-se às 96h, quando a expressão nas amostras inoculadas com Pe atinge o mesmo nível de repressão. Dado que os próprios fungos produzem poligalacturonases, a diminuição das poligalacturonases da pêra constitui um mecanismo de defesa para que não haja maior degradação das pectinas. O facto de haver uma maior diminuição da expressão no tratamento com o antagonista sugere que este potencia a paragem do metabolismo de degradação das pectinas da pêra através da inibição deste gene. A redução da poligalacturonase foi também observada em frutos de tomates, tornando-os menos susceptíveis aos necrotróficos *Rhizopus stolonifer* e *Geotrichum candidum* (Cantu et al., 2008).

4.4.3 Pectina metilesterase

Nas figuras 4.4.3.1 e 4.4.3.2, apresentam-se os resultados da quantificação da expressão de um gene codificante de um membro da família das pectinas metilesterases (PME1).

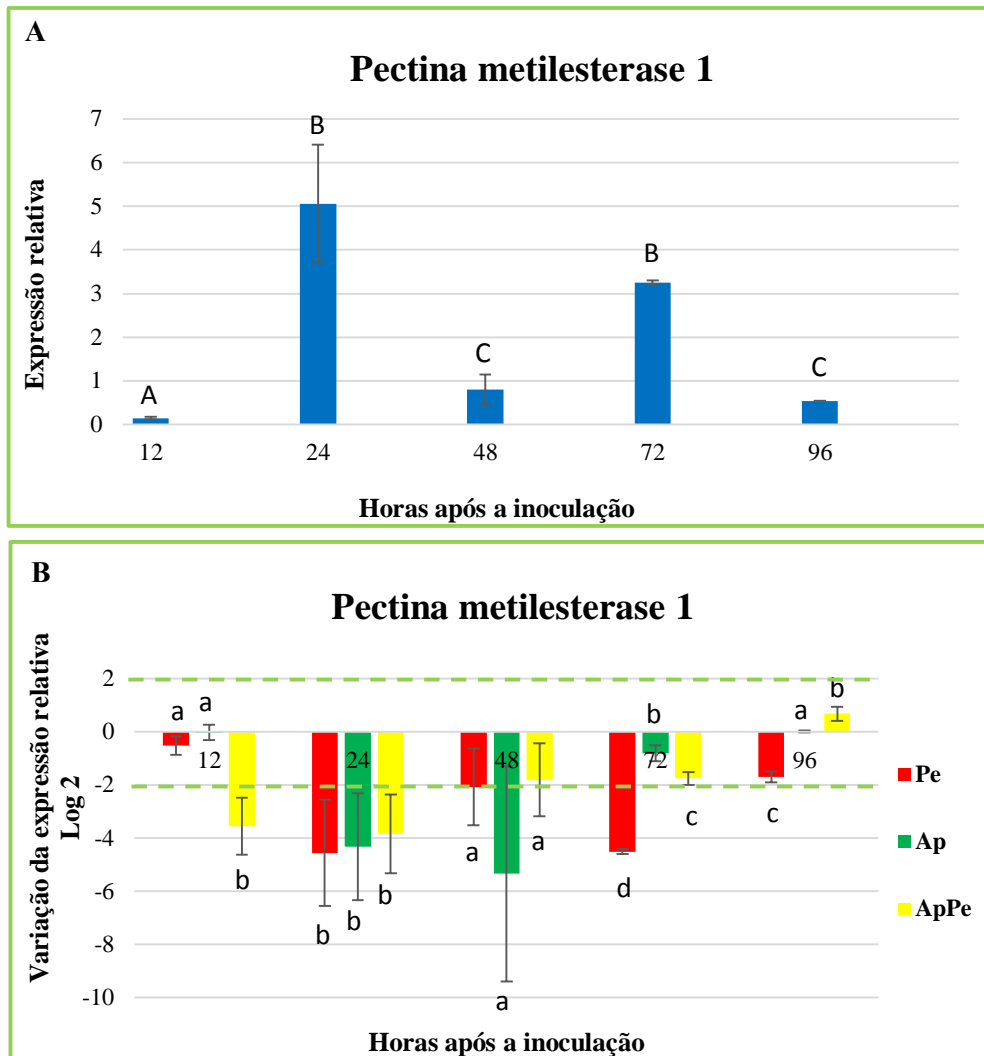


Figura 4.4.3 - Resultados da expressão da pectina metilesterase 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b, c e d) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

A expressão do gene que codifica a pectina metilesterase 1 (AB067681.1; Sekine et al., 2006) durante o tempo do ensaio em pêras usadas como controlo (Figura 4.4.3A) segue um perfil oscilatório, o que pode ser explicado pelo mecanismo de auto-regulação conhecido para as PMEs (Goulao, 2010).

De facto, a actividade de muitos dos membros desta família é superior a valores de pH próximos de 6. Contudo, nestas condições, a actividade resultante vai libertar protões, baixando o pH do meio e inibindo essa actividade. Pode ser especulado que essa inibição de actividade possa resultar também de uma redução na transcrição de genes codificantes (revisto por Goulao, 2010). A actividade dos genes de PME pode tornar as pectinas mais susceptíveis à acção de hidrolases específicas, como PGs ou pectato liases (PLs). A diminuição da degradação das pectinas foi associada a maior metilesterificação observada em frutos de tomate em que a transcrição de membros desta enzima foram geneticamente suprimidos (Goulao e Oliveira, 2008).

Na figura 4.4.3B, referente à variação da expressão do gene da pectina metilesterase 1, nos tecidos inoculados com os fungos, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da expressão da *PME1*, mas apenas nas amostras em que a interacção antagonista+patogénico existia (ApPe), numa resposta mais rápida (às 12h). Às 24h, o tecido do fruto respondeu em termos de expressão deste gene, reprimindo-o de igual modo também nas restantes condições (com os fungos inoculados individualmente). Às 72h, esta repressão manteve-se apenas nas amostras cuja inoculação incluía o patogénio mas com menor repressão quando o antagonista foi pré-inoculado. Estes resultados sugerem uma inibição diferencial da expressão da *PME1* como resposta à presença das diferentes espécies de fungos, por parte da pêra. Dado que a enzima codificada actua na pectina, contribuindo para o processo que pode levar à sua despolimerização, a diminuição da sua expressão, que poderá resultar em mais pectinas com maior grau de metilesterificação, este resultado poderá significar uma tentativa de protecção da parede celular do hospedeiro. A manutenção da sub-expressão na amostra inoculada com *P. expansum*, 72h após inoculação, poderá resultar da continuidade do processo de defesa, dada a maior agressividade nesta condição, que não é necessária na presença do antagonista não-patogénico. Um grau mais elevado de metilesterificação poderá igualmente restringir o acesso de enzimas pectolíticas fúngicas à parede da célula, e assim reduzir a sua susceptibilidade a esta degradação (Lionetti et al., 2012; Sasidharan, 2011). A correlação entre a expressão de uma isoforma da PME (*PME3*) e a esterificação da pectina foi observada por Raiola e seus colaboradores (2010), em folhas de *Arabidopsis thaliana* infectada pelo fungo *Botrytis cinerea*. Os autores reportaram um aumento de expressão significativo do gene *AtPME3*, induzido pelo fungo na planta, e a conseqüente diminuição da metilesterificação da pectina, 72 horas após a inoculação, concluindo que a isoforma *PME3* é, por si só, um factor de susceptibilidade e que é necessária ao início da colonização dos tecidos do hospedeiro. Por outro lado, também a sobreexpressão de genes que codificam proteínas inibidoras da actividade de PMEs, em plantas, resultaram num grau mais elevado de metilesterificação da pectina, tendo sido este fenómeno associado a uma maior resistência destas linhas contra infecção com *B. cinerea* (Lionetti et al., 2007). Volpi e seus colaboradores (2011) reportaram que a diminuição da actividade da enzima resulta num aumento do grau de

metilesterificação da pectina, em linhas transgênicas do trigo que expressam proteínas inibidoras da pectina metilesterase da espécie *Actinidia chinensis* (*AcPME1*) infectadas pelos fungos necrotróficos *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium graminearum*, tendo sido observado uma diminuição dos sintomas das doenças causadas pelos fungos. Os autores sugerem que o aumento de resistência das linhas transgênicas deve-se à incapacidade dos fungos colonizarem tecidos com paredes celulares contendo pectinas metil estereficadas e a uma redução da actividade de enzimas produzidas pelos fungos que hidrolisam a pectina. Na *Arabidopsis* também foi observado uma diminuição da susceptibilidade ao *B. cinerea*, devido a sobreexpressão da proteína inibidora da pectina metilesterase 1 (Cantu et al., 2008).

Neste contexto, sugere-se que a presença dos fungos poderá induzir no hospedeiro uma diminuição da expressão do gene da isoforma PME1 resultando numa diminuição da despolimerização da pectina, reforçando assim a integridade da parede celular, para restringir a progressão do patogénio.

As alterações associadas às infecções por fungos não se reflectem apenas nas pectinas mas em toda a estrutura da parede celular, por exemplo, através da modificação da matriz celulose-xiloglucano. A acção de enzimas como as endo-1,4- β -glucanase (Figura 4.4.5), xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (Figura 4.4.4.1, XTH1; Figura 4.4.4.2, XTH2) e expansina (Figura 4.4.6.1, Exp1; Figura 4.4.6.2, Exp2) poderão beneficiar o fungo, contribuindo para uma desestruturação da matriz, aumentando a acessibilidade das enzimas fúngicas.

4.4.4 Xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase

Nas figuras 4.4.4.1 e 4.4.4.2, estão representados os resultados obtidos na quantificação da expressão de 2 genes da família xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase (XTH1 e XTH2).

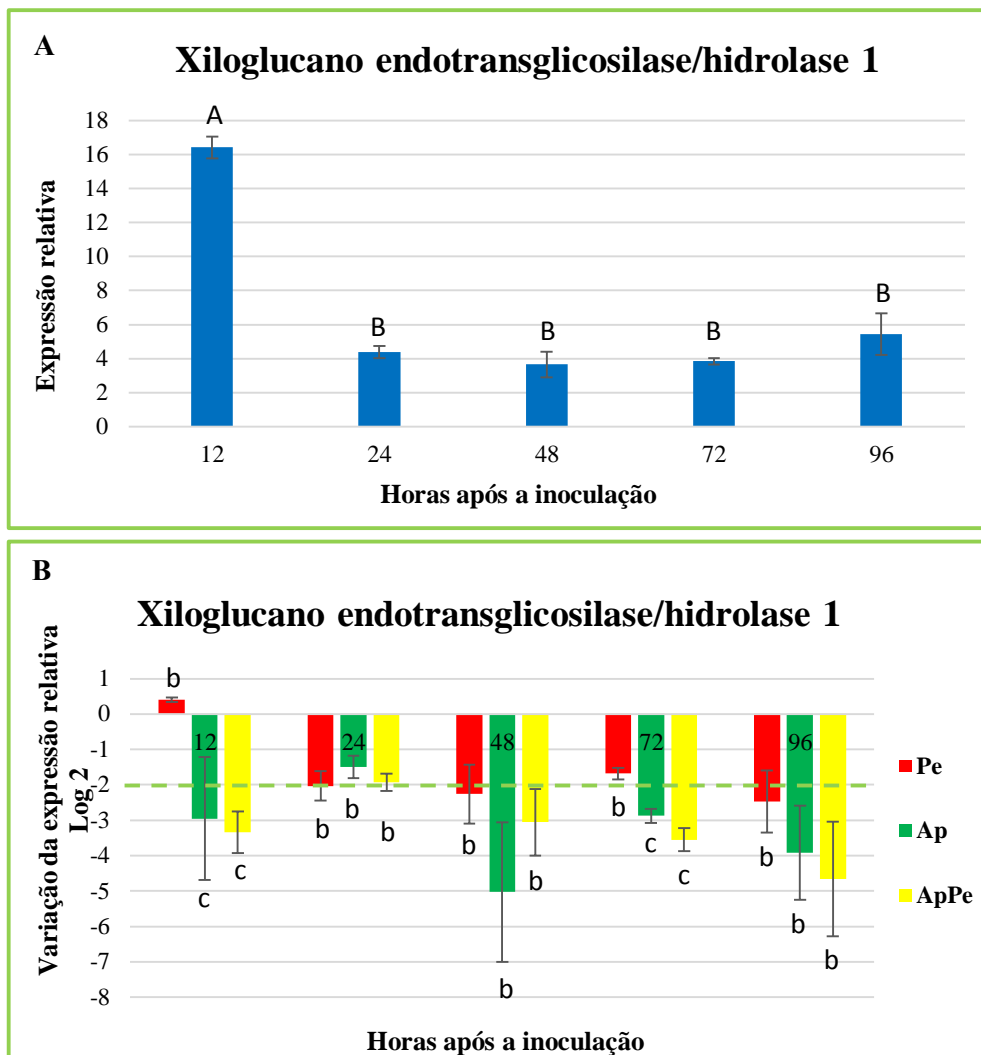


Figura 4.4.4.1 - Resultados da expressão da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) pêras em condições de controle, as letras (A e B) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Na figura 4.4.4.1A encontra-se representada a expressão do gene *xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 1* (AB095368.1; Hiwasa et al., 2002), tendo-se observado uma diminuição às 24 horas após a inoculação mantendo-se constante até às 96 horas após a inoculação.

Analisando a figura 4.4.4.1B, observou-se uma diminuição acentuada da expressão do *XTH1* nos vários tratamentos em que o antagonista foi inoculado, individualmente ou em pré-inoculação com o patogénico, sugerindo uma inibição da expressão do gene *XTH1* causada pelo antagonista. A correlação entre antagonista e a supressão de genes *XTH* com actividade de endotransglicosilase foi

observado em frutos de tomates tratados com a levedura antagonista *Cryptococcus laurentii* (Jiang et al., 2008).

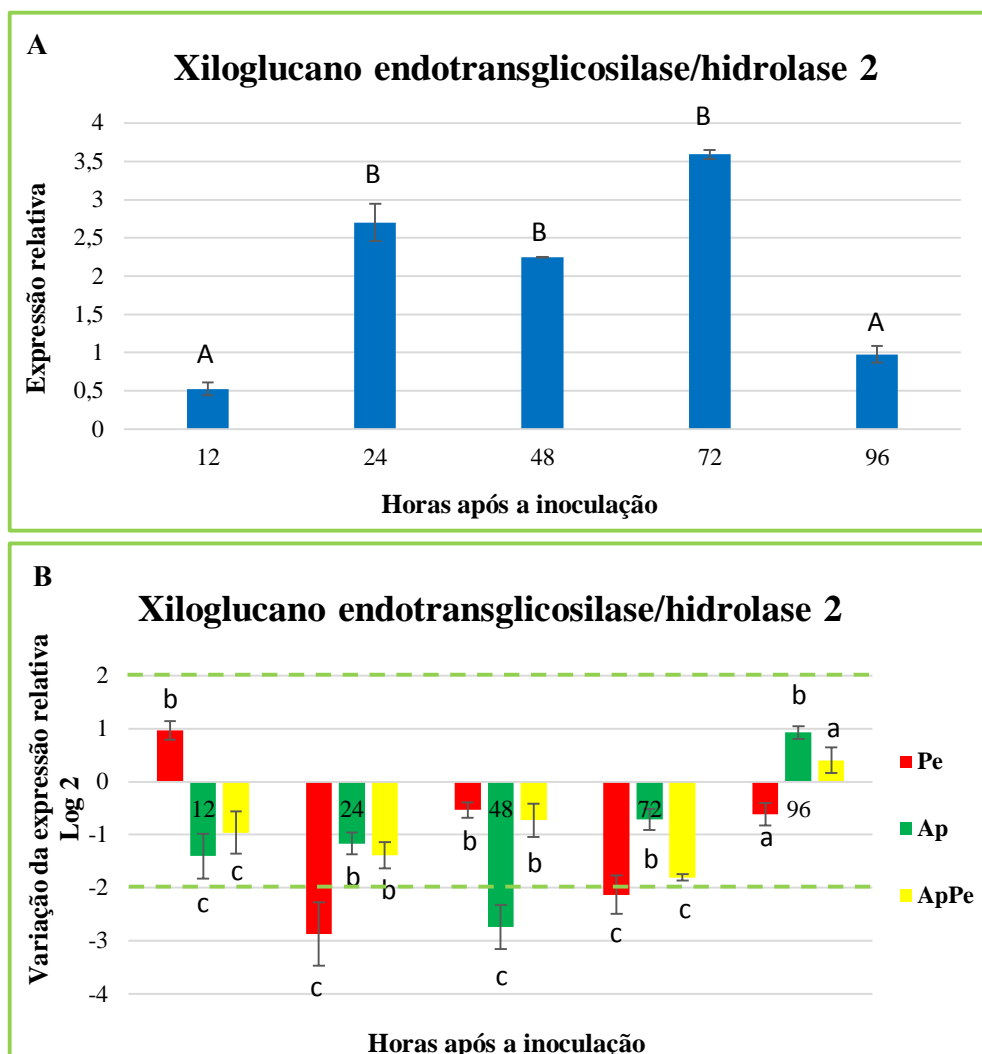


Figura 4.4.4.1 - Resultados da expressão da xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A) e C) pêras controle, as letras (A e B) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B) e D) Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Na figura 4.4.4.2A é possível observar-se a expressão do gene *xiloglucano endotransglicosilase/hidrolase 2* (AB095369.1; Hiwasa et al., 2002), tendo sido observado um aumento de 24 horas após a inoculação, padrão inverso ao observado na *XTH1*. Uma expressão

constante de um gene *XTH* foi também observado em pês ‘Rocha’, durante a maturação, sugerindo que a enzima tem um papel de manutenção do metabolismo da parede celular (Fonseca et al., 2005).

Na figura 4.4.4.2B, onde se encontram os resultados referentes à expressão do *XTH2*, verificou-se uma resposta de menor magnitude relativamente ao do gene *XTH1* e uma ausência de padrão claro de resposta relacionável com os diferentes tratamentos.

Diversos estudos sugerem uma associação entre *XTHs* e o mecanismo de defesa da planta a ataques por fungos. Em micorrizas formadas em *Medicago truncatula*, o aumento da expressão do gene *MtXTH1* facilita o desenvolvimento e a proliferação do fungo no apoplasto (Maldonado-Mendoza et al., 2005). Do mesmo modo, a infecção durante a interação tomate-Cuscuta está associada com um aumento da expressão da *LeXTH1* e da actividade da XTH (Albert et al., 2004). Contudo, a diminuição da *MdXTH1* observada em maçãs infectadas por *Penicillium expansum*, 24 e 48 horas após a inoculação, sugere que este poderá ser um factor de patogenicidade, impedindo a remodelação da parede, para que a infecção possa progredir (Muñoz-Bertomeu e Lorences, 2013). Posto isto, dado que esta família de enzimas pode actuar de duas maneiras e tendo em mente que se observou uma diminuição acentuada de *XTH1* nos tecidos tratados com o antagonista (Ap e ApPe), a diminuição da expressão de membro, poderá contribuir para um reforço da parede celular, através do reforço da matriz celulose-xiloglucano. Se a isoforma XTH1 codificar enzimas com actividade de hidrolase, responsáveis por cortes nas moléculas de xiloglucano, a sua repressão significa uma menor desestruturação da matriz celulose-xiloglucano. Caso actue como endotransglicosilase, poderá reduzir o efeito de afrouxamento da parede, de acordo com o papel conhecido de XTHs neste fenómeno (Van Sandt et al. 2007).

4.4.5 Endo-1,4- β -glucanase

Na figura 4.4.5, encontram-se os resultados obtidos na quantificação da expressão da endo-1,4- β -glucanase (EGase2).

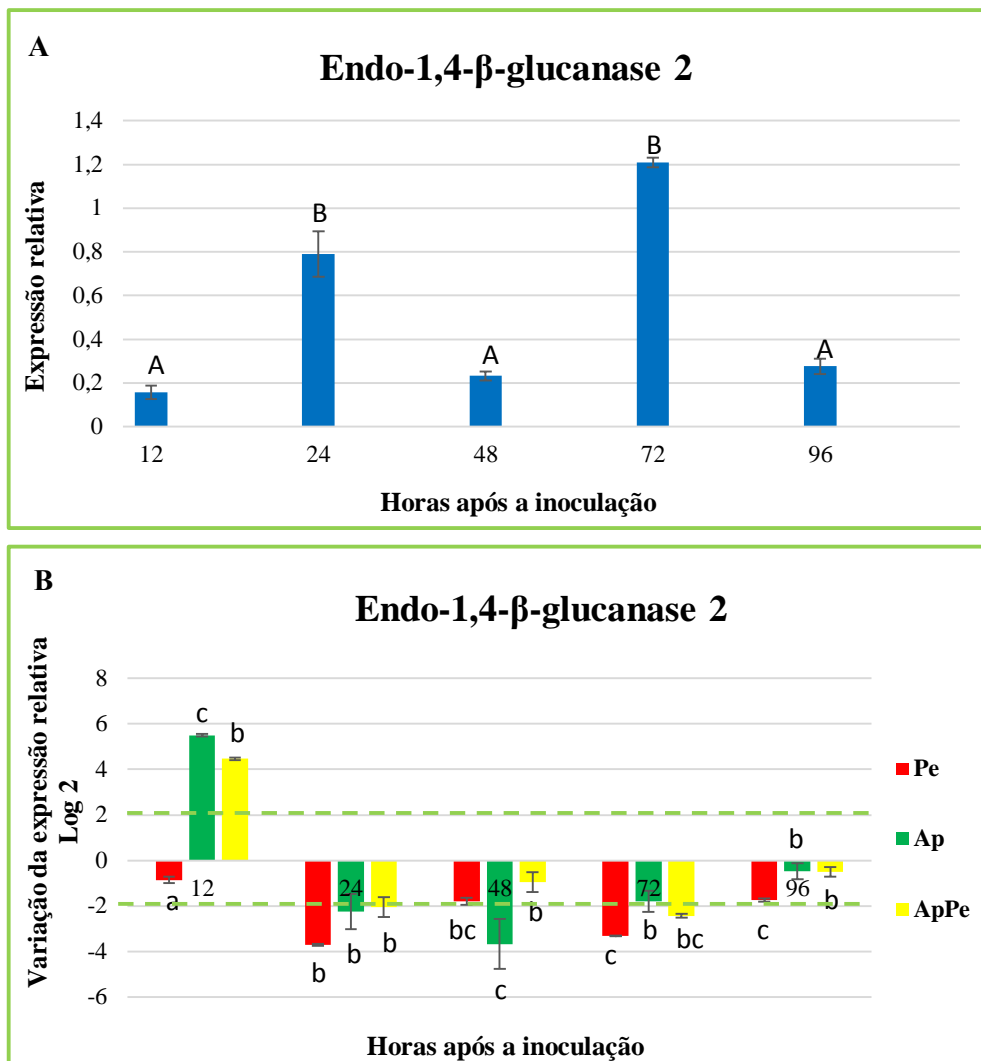


Figura 4.4.5 - Resultados da expressão da Endo-1,4-β-glucanase 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A: pêras em condições de controle, as letras (A e B) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B: Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Na figura 4.4.5A, referente ao padrão da expressão da endo-1,4-β-glucanase 2 (AB067645.1; Sekine et al., 2006) em pêras em condições de controle, observou-se uma variação oscilatória.

Analisando a figura 4.4.5B, destaca-se um aumento da expressão do gene *EGase2* nos tratamentos com o antagonista, 12 horas após a inoculação e uma tendência de diminuição significativa desta expressão na restante condição (inoculação apenas com o patógeno), entre as 24 e as 72h horas após a inoculação. Os resultados sugerem uma menor expressão do gene nos tecidos da pêra, na presença de *P. expansum*. Dado que a enzima promove a degradação das microfibrilas de hemiceluloses (ou certas regiões das cadeias de celulose), a diminuição da sua actividade resultará

numa tentativa de reforço da matriz xiloglucano-celulose, com vista ao aumento de resistência do tecido do fruto contra o patogénio. Níveis mais baixos de enzima EGase1 foram também observados em tomates após a infecção com *P. expansum* ou *B. cinerea*, suportando a ideia de que há uma relação entre as EGases, respostas de defesa da planta e a patogenicidade (Real et al., 2004). Por outro lado, a sua indução às 12h em tecidos na presença do antagonista pode significar um passo de um processo de remodelação da parede, com vista ao seu reforço, em conjugação com outras enzimas. É interessante verificar que se observou um padrão oposto entre a expressão de *EGase* e *XTHs* às 12h, reforçando a ideia de ajustamento desta matriz neste momento da interação. Vários estudos suportam um diferente envolvimento de *EGases* nas interações planta-patogénio. A supressão da expressão do gene que codifica duas isoformas (*LeEGase1* e *LeEGase2*) contribuiu para a redução da susceptibilidade na planta do tomateiro ao necrófago *Botrytis cinerea* e associada à acumulação de calose (Flors et al., 2007; Finiti et al., 2013). Esta acumulação observada 72 horas após a inoculação deve-se, segundo os autores, ao facto da calose ser um possível substrato e que a ausência de actividade da EGase poderá levar à correspondente activação de mecanismos de defesa no hospedeiro (Flors et al., 2007). No entanto, em frutos transgénicos suprimidos por abordagem antisense na expressão de *EGase1* e *EGase2* do tomate, Flors e seus colaboradores (2007) não evidenciaram alterações de susceptibilidade ao *B. cinerea*. Ainda assim, em frutos do mutante natural de tomate *rin* (frutos que mostram uma inibição do processo de maturação), os mesmos autores observaram que o aumento de expressão do membro *EGase2* facilitou a expansão do patogénio, justificando que o patogénio poderá aproveitar-se da atividade da enzima, dado que esta está envolvida no amolecimento dos frutos, uma vez que este estado contribui para susceptibilidade do fruto a patogénios.

4.4.6 Expansina

O padrão de expressão de duas das isoformas da expansina, a 1 (Exp1) e a 2 (Exp2), encontra-se reflectido nos gráficos 4.4.6.1 e 4.4.6.2.

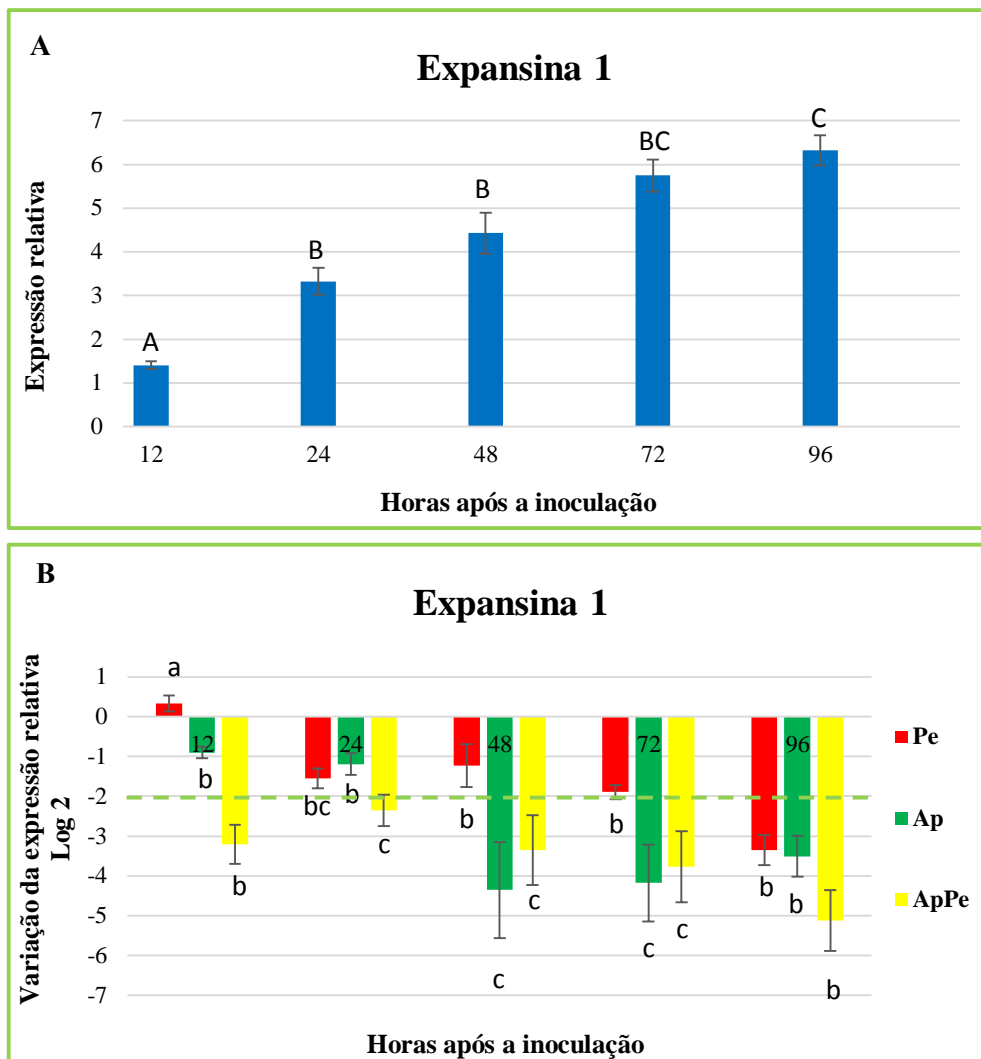
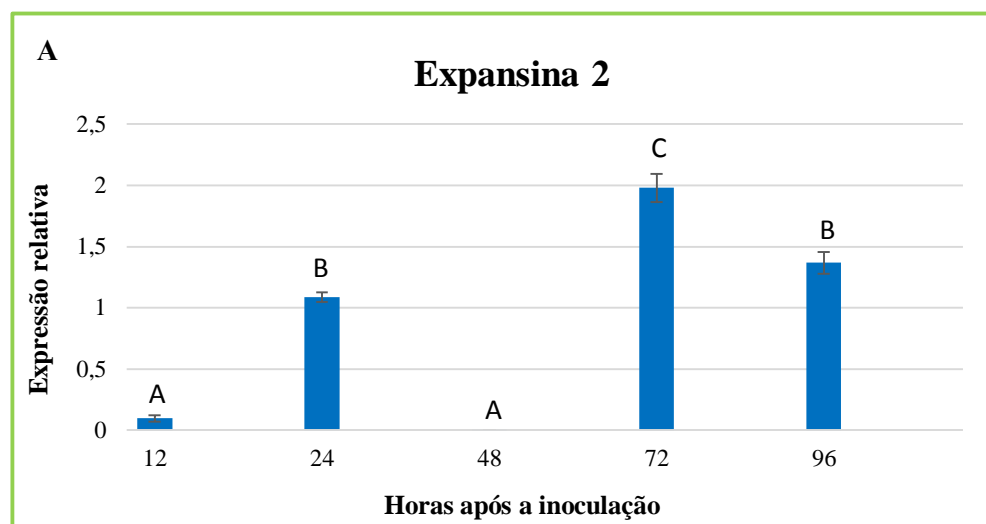


Figura 4.4.6.1- Resultados da expressão da expansina 1 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A: pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B: Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. As letras (a, b e c) indicam diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Relativamente ao padrão de expressão do gene que codifica a isoforma expansina 1 (AJ811691.1; Fonseca et al., 2005) em pêras em condições controlo durante a maturação (figura 4.4.6.1A) observou-se um aumento da expressão ao longo do tempo. Dado que esta proteína actua na promoção da quebra das ligações de pontes de hidrogénio entre as microfibrilhas de celulose e polímeros de xiloglucano, os resultados sugerem um aumento da desestruturação da parede celular, provavelmente induzido pelo avançar do estado de maturação e eventualmente potenciado pelo fermento. De facto, em frutos de tomate no estado imaturo (verdes) foi observado que este gene aumenta após o fermento (Cantu et al., 2009). Analisando a figura 4.4.6.1B, referente à expressão

do gene da *expansina 1* nos vários tratamentos em contraste com o controlo, observou-se uma diminuição significativa, nos diferentes tempos, nos tratamentos em que o antagonista esteve envolvido. Esta repressão começou por ser específica da resposta à interacção *A. pullulans* + *P. expansum*, sendo depois semelhante às condições em que o antagonista foi inoculado isoladamente. Os resultados sugerem a acção de um mecanismo de defesa induzido pelo *A. pullulans*, através da inibição da acção da expansina 1, reforçando a parede celular. A correlação positiva entre a firmeza e diminuição da expressão da *Exp1*, foi reportado por Brummell e seus colaboradores (2001) que observaram, em tomates, um aumento da firmeza nos frutos onde foi suprimida a *Exp1*. Ainda assim, não foi suficiente para impedir o desenvolvimento de lesões em resposta à infecção com patógenos (*B. cinerea* e *A. alternata*). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem então que este gene pode estar envolvido na resposta de defesa, mas que a colonização geral depende da resposta conjunta de mais factores. Neste contexto, é de referir que não se observaram sinais visíveis da progressão da infecção no tratamento ApPe (Figura 4.1H), no presente estudo, até 72 horas após a inoculação, o que sugere que a presença do antagonista induz a inibição da actividade da proteína, reforçando a matriz celulose-xiloglucano, impedindo a proliferação do *P. expansum* dado que haverá uma paragem da extensão e relaxamento da parede que contribuem para a acessibilidade a enzimas produzidas pelo patógeno.



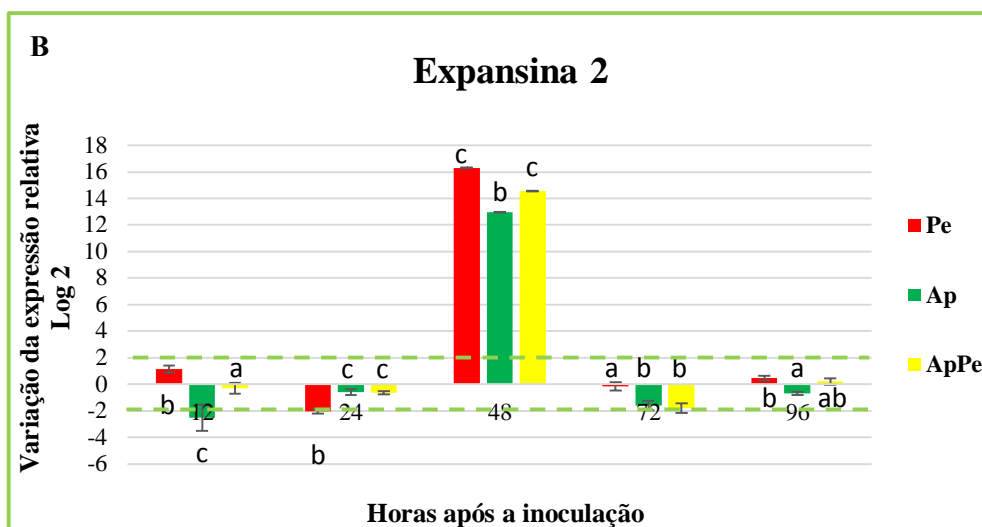


Figura 4.4.6.2 - Resultados da expressão da expansina 2 em pêras Rocha, 12, 24, 48, 72 e 96 h após a inoculação. A: pêras em condições controlo, as letras (A, B e C) indicam diferenças estatísticas entre tempos $P < 0,05$; B: Pe, pêras inoculadas com *P. expansum*; Ap, pêras inoculadas com *A. pullulans*; e ApPe, pêras inoculadas com os dois fungos, *A. pullulans* e *P. expansum*. A letra b indica diferenças estatísticas entre tratamentos $P < 0,05$. Para cada tempo, os valores representam a média \pm erro padrão.

Os resultados do padrão da expressão da expansina 2 (AJ811692.1; Fonseca et al., 2005) em pêras controlo, encontram-se representados na figura 4.4.6.2A, tendo-se observado uma inesperada diminuição da expressão às 48 horas após a inoculação.

No padrão da expressão da *Exp2* referente aos vários tratamentos em contraste com o controlo (figura 4.4.6.2B), observou-se uma baixa expressão nos diferentes tratamentos, com a excepção de um pico da expressão 48 horas após a inoculação. Analisando colectivamente as figuras 4.4.6.2A e 4.4.6.2B, pode especular-se que as pêras sofreram um efeito que se traduziu em alterações na expressão deste gene às 48h, e que se reflectiu na comparação dos efeitos dos tratamentos. No entanto, podem observar-se neste tempo níveis de expressão genericamente superiores nas amostras inoculadas apenas com o *P. expansum*, relativamente às inoculações nas restantes condições. Esta observação está de acordo com a discussão apresentada acima, referente ao gene da *Expansina 1*.

Efeitos sinérgicos são também conhecidos. Dado que a enzima induz extensão e stress-relaxamento da parede, a supressão da expansina contribuirá para um reforço da mesma e para uma diminuição da acessibilidade a outras enzimas aos polímeros da parede celular (Hiwasa et al., 2003). Por exemplo, em tomates, a supressão da *poligalacturonase* e da *expansina 1* diminui a susceptibilidade ao *B. cinerea* e aumenta significativamente a firmeza do fruto (Cantu et al., 2008). No presente trabalho, os resultados reforçam a hipótese de que ambas as isoformas PG2 e Exp1

(figuras 4.4.2.2 e 4.4.6.1, respectivamente) poderão ser importantes na susceptibilidade ao *P. expansum*, uma vez que é possível observar-se uma diminuição acentuada, induzida pelo *A. pullulans*, às 48h e 72 horas após a inoculação.

4.5 Análise global dos padrões de expressão génica nas diferentes famílias

Do ponto de vista da expressão génica, os resultados revelam que, entre os 9 genes cuja expressão foi quantificada nas condições ensaiadas, todos mostraram expressão modificada na presença de infecção. Nas primeiras 24h, esta alteração no padrão de expressão seguiu a mesma tendência de diferença entre as amostras inoculadas apenas com o patógeno (Pe) e as amostras em que estava presente o antagonista (Ap e ApPe). Este padrão foi notado logo às primeiras 12h para os genes *PG2*, *XTH1*, *XTH2*, *EGase* e *EXP1*. No caso dos transcritos de *PG1*, *XTH2* e *EXP2*, esta alteração verificou-se 24h após as inoculações (Anexo D, tabela 3). Colectivamente, e uma vez que a escolha destes membros específicos deveu-se à associação da sua expressão com o processo de amolecimento durante a maturação (Hiwasa et al., 2002; Hiwasa et al., 2003; Fonseca et al., 2005; Sekine et al., 2006), podemos concluir que existe uma reestruturação da parede celular em resposta às infecções, e que esta resposta é dependente da presença do antagonista. De notar que, a expressão do gene *PME1* teve uma resposta independente da interação.

4.6 Diferenças entre resultados obtidos através de quantificação de actividades enzimáticas e expressão génica

O padrão de expressão temporal dos diferentes genes que codificam enzimas modificadoras da parede celular (β -Gal, PG, PME, XTH, EGase e EXP), analisados por PCR quantitativo em tempo real, mostraram que todos os genes foram diferencialmente expressos nos diferentes tratamentos (controlo, Ap, Pe e ApPe), o que sugere que estas poderão estar associadas às interações patógeno-fruto-antagonista, contribuindo para as modificações da parede celular do hospedeiro.

Todas as actividades enzimáticas quantificadas às 12 e 24 horas após inoculação (β -Gal, exo-PG, endo-PG, PME e EGase), referentes às mesmas famílias para as quais se estudou também a expressão génica de alguns dos seus membros, mostraram padrões não-relacionados. É de referir que estas diferenças poderão ser derivadas dos diferentes padrões de expressão de distintos membros de genes, pertencentes à mesma família de enzimas que, quando combinadas, poderão contribuir para a actividade total da enzima (Goulao e Oliveira, 2008). Este aspecto pode ser ilustrado pela concordância da tendência de alteração dos padrões de expressão de um gene que codifica β -Gal e a actividade total desta família, apenas às 12h. O facto desta relação se inverter às 24h, sugere que

outros genes da mesma família estarão envolvidos para contribuir para a actividade total. De facto, estes genes estão presentes em famílias muito alargadas. Em espécies com o genoma sequenciado como a videira (*Vitis vinifera*), foram verificados, em 2012, 30 EXPs, 33 XTHs, 21 EGases, 36 PMEs e 60 PGs (Goulao et al., 2012). Este número continua a ser revisto, de acordo com as posteriores anotações do genoma. Assim, tomando com exemplo ilustrativo a β -Gal, podemos especular que membros envolvidos no processo de solubilização das pectinas actuam 12h após as inoculações (o que é suportado pela diminuição também da actividade de AFase), enquanto o seu aumento após 24h de interacção, poderá dever-se à acção de outros membros envolvidos em resposta que desencadeia sinalização. O mesmo fenómeno pode ser explicado na discussão do aumento da actividade de exo-PG às 24h, quando já não existem diferenças na actividade de endo-PG.

Contudo, podem também dever-se a diferentes “origens” das enzimas dado que nas actividades totais são medidas, não só as enzimas produzidas pelo hospedeiro mas também, as produzidas pelo patogénio e antagonista enquanto a expressão génica permite quantificar transcritos específicos do hospedeiro. É importante também reconhecer que nenhum ensaio *in vitro* poderá garantir identidade com o modo como uma enzima realmente actua *in vivo*, dado que não é possível igualar as condições do ensaio às condições *in vivo* (Goulao e Oliveira, 2008), havendo diferenças no substrato, pH óptimo, na força iónica ou potencial redox, a presença de promotores específicos, inibidores, que não estão presentes nas misturas de reacção nos ensaios *in vitro* (Goulao e Oliveira, 2008).

5. Conclusões e perspectivas futuras

Várias diferenças estruturais nas pectinas, hemiceluloses, celulose e lenhina, poderão ser responsáveis pelas modificações que ocorrem na parede celular em resposta não só ao desenvolvimento, como também a estímulos abióticos e bióticos (Miedes e Lorences, 2004). Diferenças estas que podem variar consoante a espécie, o seu estado de desenvolvimento e que pode manifestar-se em regiões muito específicas e localizadas dentro de certos tipos de tecidos ou mesmo domínios na mesma célula (Goulao et al., 2007).

Neste trabalho pretendeu-se investigar se existem diferenças que ocorrem na parede celular de pêras Rocha em resposta ao patogénio *Penicillium expansum* e ao antagonista *Aureobasidium pullulans*, com o principal intuito de esclarecer a existência ou não de um mecanismo de defesa por parte do hospedeiro quando exposto a estes fungos, em ensaios de biocontrolo.

As três abordagens complementares seguidas: quantificação de compostos antioxidantes e

fenólicos, actividades enzimáticas e expressão de genes de famílias relacionadas com modificações da parede celular, sugerem, de facto, a existência de uma resposta do hospedeiro, dependente da sua exposição ao agente antagonista. Sugere-se um aumento de lenhificação e de redução de despolimerização de polímeros da parede celular e/ou aumento de respostas de defesa através da libertação de moléculas sinalizadoras, promovido pelo *A. pullulans*.

Os resultados aqui apresentados abrem novas linhas de investigação. A quantificação da lenhina deverá ser feita, para comprovar a hipótese sugerida pelos resultados obtidos quanto à quantificação de antioxidantes. Poderá ser acompanhada pelo estudo do padrão das actividades enzimáticas de enzimas antioxidantes, como a fenilalanina amónia liase, peroxidases; ou a análise de componentes (espécies reactivas de oxigénio) também associados com a resposta de defesa dos frutos a stresses bióticos.

A hipótese de defesa devido a cascatas de sinalização poderá também ser estudada com maior profundidade através da quantificação de genes marcadores presentes nestas vias, como moléculas de ácido salicílico e/ou jasmónico, que se sabe induzirem a resistência contra patogénicos.

Numa perspetiva futura, seria ainda interessante investigar as modificações específicas na estrutura dos polissacarídeos, através, por exemplo, da detecção por imunolocalização, ou usando “macroarrays de polissacáridos” com anticorpos específicos para epitopos da parede celular.

6. Referências Bibliográficas

- Abano, E.E., Sam-Amoah, L. 2012. Application of antagonistic microorganisms for the control of postharvest decays in fruits and vegetables. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2(1), 1-8.
- Ahmad, S., Veyrat, N., Gordon-Weeks, R., Zhang, Y.H., Martin, J., Smart, L., Glauser, G., Erb, M., Flors, V., Frey, M., Ton, J. 2011. Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiol.* 157, 317–327.doi:10.1104/pp.111.180224
- Ahmed, E.E., Labavitch, J.M. 1980. Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit II. Changes in carbohydrate-degrading enzymes in ripening ‘Bartlett’ pears. *Plant Physiol.* 65, 1014-1016.
- Alves, M. 2007. Avaliação do potencial de leveduras dos géneros *Pseudozyma* e *Rhodosporidium* no controlo biológico pós-colheita de bolores. Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, Portugal.
- ANP, Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha. 2014. Pêra Rocha do Oeste. Acedido a 1 de Julho de 2014, em <http://www.pêrarochoa.pt/>.
- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2014. Biocontrol activity

- of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *Int. J. Food Microb.* 182–183, 1–8.
- Bantog, N.A., Yamada, K. Yamaki, S. GAPDH from Japanese Pear 'Hosui'. Published Only in Database in NCBI.
- Barreiro, M.G., Santos, M., Ramos, A.P., Pais, I., Silva, M.J. 2006. Improvement of *Aureobasidium pullulans* efficacy against postharvest blue mold decay of 'Rocha' pears. In *Actas de Horticultura do VIII Simpósio Nacional y V Ibérico Maduración y Post-recolección*, Orihuela, pp. 393-397
- Baxter, H.L., Stewart Jr, C.N. 2013. Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. *Biof.* 4(6), 635-650.
- Bellincampi, D., Cervone, F., Lionetti, V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Front Plant Sci.* 5, 228.
- Bennett, A.B., Grant, M., Garcia-Agustin, P., Gonzalez-Bosch, C., Fischer, I.H., Zanette, M.M., Spósito, M.B., Amorim, L. 2011. Doenças pós-colheita em laranja 'Valência' e caracterização da população fúngica em pomares orgânicos e convencionais. *Tropical Plant Pathol.* 36(6), 390-399.
- Bily, A.C., Reid, L.M., Taylor, J.H., Johnston, D., Malouin, C., Burt, A.J., (2003). Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 93, 712–719. doi: 10.1094/PHYTO.2003.93.6.712
- Bordbar, F.T., Etebarian, H.R., Sahebani, N., Rohani, H. 2010. Control of postharvest decay of apple fruit with *Trichoderma virens* isolates and induction of defense responses. *J. Plant Prot. Res.* 50(2), 146-152.
- Borges, M., Pedro, J.M. & Barreiro, M.G. 2004. Biological control of postharvest decay with epiphytic microorganisms of Rocha pear. In Barreiro, M.G. (Eds), *Maturação e pós-colheita – Frutos e Hortícolas*, Oeiras, pp. 513-517.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25–30.
- Brett, C.T., Waldron, K.W. 1996. The molecular components of the wall. In: Brett, C.T., Waldron, K.W. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*. 2. ed. London: Chapman & Hall, 1996. p. 5-43. cap. 2.
- Campbell, A.D., Huysamer, M., Stotz, H.U., Greve, L.C., Labavitch, J.M. 1990. Comparison of Ripening Processes in Intact Tomato Fruit and Excised Pericarp Discs. *Plant Physiol.* 94,

1582-1589.

- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. 2008. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proc Natl Acad Sci.* 105(3), 859–864.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. 2007. Genetic Determinants of Textural Modifications in Fruits and Role of Cell Wall Polysaccharides and Defense Proteins in the Protection Against Pathogens. *Fresh Produce.* 1(2), 101-110.
- Carpita, N., Tierney, M., Campbell, M. 2001. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol. Biol.* 47, 1-5.
- Castoria, R., Caputo, L., De Curtis, F., De Cicco, V. 2003. Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: A possible new mechanism of action. *Phytopathol.* 93, 564-572.
- Chen, J., He, L., Jiang, Y., Kuang, J., Lu, C., Joyce, D., Macnish, A., He, Y., Lu, W. 2009. Expression of PAL and HSPs in fresh-cut banana fruit *Environ. Exp. Bot.*, 66, 31–37.
- Chung, T.T., West, G., Tucker, G.A. 2006. Effect of wounding on cell wall hydrolase activity in tomato fruit. *Post. Biol. Technol.* 40(3), 250–255.
- Coates, L.M., Johnson, J.I. 1997. Postharvest diseases of fruit and vegetables. in: *Plant Pathogens and Plant Diseases.* J. F. Brown, and H. J. Ogle, eds. Rockvale Publications, Armidale, Australia. 533-548.
- Corrent, A. 2007. Expressão diferencial de cDNAs de maçãs cv. Fuji em resposta à inoculação com fungos *Botryosphaeria dothidea* e *Penicillium expansum* e o tratamento térmico em pós-colheita. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R.K., Muck, A., Mithofer, A., Shetty, S.H. 2010. Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defense. *J. Phytopathol.* 158, 585–593. doi:10.1111/j.1439-0434.2010.01669.x
- Delaunois, B., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., Cordelier, S. 2014. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Front. Plant Sci.* 5 (249) doi: 10.3389/fpls.2014.00249
- Durbin, M.L., Lewis, L.N. 1988. Cellulases in *Phaseolus vulgaris*. *Methods Enzymol.* 160, 342–351.
- El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2003. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phyto.* 93, 344-348.
- Eynck, C., Seguin-Swartz, G., Clarke, W.E., Parkin, I.A.P. 2012. Monolignol biosynthesis is

- associated with resistance to *Sclerotinia clerotiorum* in *Camelina sativa*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 887–899. doi:10.1111/j.1364-3703.2012.00798.x
- Faize, M., Faize, L., Ishizaka, M., Ishii, H. 2004. Expression of potential defense responses of Asian and European pears to infection with *Venturia nashicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 64 (6), 319-330.
- Fernandes, D. 2009. Impacto de processos físicos na componente bioactiva e na estabilidade de polpas de pêra. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Ferreira-Pinto, M.M., Moura-Guedes, M.C., Barreiro, M.G., Santos, M. 2008. The antagonistic activity of *Aureobasidium pullulans* to reduce blue mold in 'Rocha' pear. In: Webster, A.D., Oliveira, C.M. (Eds). *Proc. Xth on Pear. Acta Hort.* 800, 921-927.
- Finiti, I., Leyva, M.O., López-Cruz, J., Rodrigues, B.C., Vicedo, B., Angulo, C. 2012. Functional analysis of endo-1,4- β -glucanases in response to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* reveals their involvement in plant–pathogen interactions. *Plant Biol.* 15, 819–831.
- Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 24, 1043–1048.
- Flors, V., Ton, J., VanDoorn, R., Jakab, G., Garcia-Agustin, P., Mauch-Mani, B. 2008. Interplay between JA, SA and ABA signaling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* 54, 81–92. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03397.x
- Flors, V., Leyva, M., Vicedo, B., Finiti, I., Real, M.D., Garcia-Agustin, P., Bennett, A.B., Gonzalez-Bosch, C. 2007. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant J.* 52, 1027–1040. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03299
- Fonseca, S., Monteiro, L., Barreiro, M.G., Pais, M.S. 2005. Expression of genes encoding cell wall modifying enzymes is induced by cold storage and reflects changes in pear fruit texture. *J Exp Bot.* 56 (418), 2029–2036.
- Fonseca, S., Hackler, Jr., Zvara, A., Ferreira, S., Balde', A., Dudits, D., Pais, M.S., Puskás, L.G. 2004. Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. *Plant Sci.* 167, 457-469.
- Francesco, A., Mari, M. 2014. Use of biocontrol agents in combination with physical and chemical treatments: efficacy assessment. *Stewart Posthar. Rev.* 1:2.

- Frisvad, J., Samson, R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 49, 1-174.
- Fry, S.C., Smith, R.C., Renwick, K.F., Martin, D.J., Hodge, S.K., Matthews, K.J. 1992. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall loosening enzyme activity from plants. *Biochem J.* 282, 821-828.
- Gantulga, D., Ahn, Y.O., Zhou, C., Battogtokh, D., Bevan, D.R., Winkel, B.S., Esen, A. 2008. Comparative characterization of the *Arabidopsis* subfamily α 1 beta-galactosidases. *Phytochem.* 70(17,18), 1999-2009.
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M., Gaur, M.K. 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *Afr. J. Biotechnol.* 9(47), 7989-7997.
- Gomathi, V., Gnanamanickam, S.S. 2004, Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. *Cur. Sci.* 87(9), 1211-1217.
- Goulao, L.F., Fernandes, J.C., Lopes, P., Amâncio, S. 2012. Chapter 9: Tackling the Cell Wall of the Grape Berry. *The Biochemistry of the Grape Berry*, Ed. E. Gerós, Bentham Pub. 172-193.
- Goulao, L.F., Almeida, D.P., Oliveira, C.M. 2010. Effect of enzymatic reactions on texture of fruits and vegetables. In: *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications* (Ed.: A. Bayindirli). CRC Press, USA.
- Goulao, L.F. 2010. Pectin de-esterification and fruit softening: revisiting a classical hypothesis. *Stewart Posthar. Rev.* 6: 1-12.
- Goulao, L.F., Oliveira, C.M. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci Technol* 19, 4-25.
- Goulao, L.F., Santos, J., de Sousa, I., Oliveira, C.M. 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 307-318.
- Goulão, L.F. 2005. Identification, cDNA cloning and expression, and enzymatic activity of proteins involved in ripening and softening of apple (*Malus x domestica* Borkh. cv 'Mondial Gala') fruits. Tese de doutoramento. Instituto Superior de Agronomia, – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp 269.
- Govrin, E.M., Levine, A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol.* 10(13), 751-7.
- Gross, K.C. 1982. A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *HortScience* 17, 933–934.

- Jiang, F., Zheng, X., Chen, J. 2008. Microarray analysis of gene expression profile induced by the biocontrol yeast *Cryptococcus laurentii* in cherry tomato fruit. *Gene* 430, 12–16.
- Jurick, W.M., Vico, I., Gaskins, V.L., Garrett, W.M., Whitaker, B.D., Janisiewicz, W.J., Conway, W.S. 2010. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* during postharvest decay of ‘Anjou’ pear. *Phytopathol.* 100, 42-48.
- Hagerman, A.E., Austin, P.J. 1986. Continuous Spectrophotometric Assay for Plant Pectin Methyl Esterase. *J. Agric. Food Chem.* 34, 440-444.
- Hématy, K., Cherk, C., Somerville, S. Host–pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 406–413.
- Henriques, C. 2009. Desenvolvimento de Polpa de Pêra Rocha – Estabilização química e estudo na componente bioactiva. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Hiwasa, K., Nakano, R., Hashimoto, A., Matsuzaki, M., Murayama, H., Inaba, A., Kubo, Y. 2004. European, Chinese and Japanese pear fruits exhibit differential softening characteristics during ripening. *J. Exp. Bot.* 55(406), 2281–2290.
- Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54 (383), 771-779.
- Hiwasa, K., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2002. Expression analysis of genes encoding xyloglucan endotransglycosylase during ripening in pear fruit. *Acta Hort. (ISHS)* 628:549-553 http://www.actahort.org/books/628/628_69.htm.
- Huckelhoven, R. 2007. Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101–27.
- Hwang, J., Choi, Y., Kang, J., Kim, S., Cho, M., Mihalte, L., Park, Y. 2011. Microarray Analysis of the Transcriptome for Bacterial Wilt Resistance in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 39(2), 49-57.
- Ippolito, A., Sanzani, S.M. 2011. Control of postharvest decay by the integration of pre- and postharvest application of nonchemical compounds. *Acta Hort.* 905, 135-143.
- Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, C.L., Wisniewski, M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biol. Technol.* 19, 265-272.
- Janisiewicz, W.J., Korsten, L. 2002. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits. *Annu. Rev.*

Phytopathol. 40, 411–41.

- Janisiewicz, W.J., Bors, B. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3261-3267.
- Jurick, W.M., Vico, I., Gaskins, V.L., Garrett, W.M., Whitaker, B.D., Janisiewicz, W.J., Conway, W.S. 2010. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* during postharvest decay of ‘Anjou’ pear. *Phytopathol.* 100, 42-48.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Tec.* 40(5), 99-104.
- Karakurt, Y., Huber, D.J. 2002. Activities of several membrane and cell-wall hydrolases, ethylene biosynthetic enzymes, and cell wall polyuronide degradation during low-temperature storage of intact and fresh-cut papaya (*Carica papaya*) fruit. *Post. Biol. Technol.* 28, 219-229.
- Kim, S.G., Wang, Y., Lee, K.H., Park, Z.Y., Park, J., Wu, J., Kwon, S.J., Lee, Y.H., Agrawal, G.K., Rakwal, R., Kim, S.T., Kang, K.Y. 2013. In-depth insight into in vivo apoplast secretome of rice-Magnaporthe oryzae interaction. *J. Proteomics* 78, 58–71. doi:10.1016/j.jprot.2012.10.029
- Lara, C. 2014. Controlo Biológico de doenças de pós-colheita. In: *Voz do Campo*, 38.
- Lara, C.S. & Barreiro, M.G. 2012. Controlo biológico de doenças de pós-colheita: situação actual e perspectivas futuras. *Rev Ass Port Hort*, 108, 29-33.
- Li, B., Lai, T., Qin, G., Tian, S. 2009. Ambient pH Stress Inhibits Spore Germination of *Penicillium expansum* by Impairing Protein Synthesis and Folding: A Proteomic-Based Study. *J Prot Res.* 9, 298–307.
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., Pais, I.P., Carvalho, C.S., Santos, M., Arrabaça, J.D., Barreiro, M.G. 2012a. Antagonist Activity between *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium expansum* in *Pyrus communis* L. cv. Rocha – Implications on the Resistance to Oxidative Stress. In: *Book of Abstracts of the 28th International Horticultural Congress (Science and Horticulture for People)*, Lisboa, vol. II, p. 22-27.
- Lidon, F.C., Ramalho, J.C., Pais, I.P., Carvalho, C.S., Ramos, A.P., Barreiro, M.G. 2012b. Antagonist Activity between *Aureobasidium pullulans* and *Penicillium expansum* in *Pyrus communis* L. cv. Rocha – Implications on the Antioxidant Defence System. In: Cantwell, M.I., Almeida, D.P.F. (Eds.). *Proc. XVIIIth IHC – IS on Postharvest Technology in the Global Market. Acta Hort.* 934, 393-399.

- Lidon, F., Ramalho, J., Pais, I., Ramos, A., Santos, M., Arrabaça, J., Barreiro, M. 2012c. Fungistatic action of *Aureobasidium pullulans* on *Penicillium expansum* in “Rocha” pear: implications for oxidative stress during fruit storage. *Inter J Pest Manag*, 58:1, pp. 41-52.
- Lima, D.U., Santos, H.P., Tiné, M.A., Molle, F.R.D., Buckeridge, M.S. 2001. Patterns of expression of cell wall related genes in sugarcane. *Gen Mol Biol*, 24 (1-4), 191-198.
- Lionetti, V., Cervone, F., Bellincampi, D. 2012. Methyl esterification of pectin plays a role during plant–pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J. Plant Physiol.* 169, 1623–1630.
- Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, I., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., Bellincampi, D. 2007. Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant. Physiol.* 143, 1871-80.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., Luo, Y. 2005. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biol. Technol.* 35 (3), 262-269.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 183–193. doi:10.1094/MPMI-07-10-0149
- Macneil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem*, Palo Alto, 53, 625-663.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., Bertolini, P. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biol, Technol.* 73, 56–62.
- Mari, M., Neri, F., Bertolini, P. 2010. New Approaches for Postharvest Disease Control in Europe. In: *Postharvest Pathology Plant Pathology in the 21st Century.* 2, 119-135.
- Marques, I.S. 2012. Conservação de frutas: Redução de doenças de pós-colheita em pêra ‘Rocha’. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Martínez-Romero, D., Ramos, P., Santos, M., Barreiro, M.G., Ferreira-Pinto, M.M. 2010. Effect of controlled atmosphere gases (CO₂, O₂ e ethylene) on growth and survival of *Aureobasidium pullulans*. In: Cantwell, M.I., Almeida, D.P.F. (Eds). *Proc XVIIIth IHC-IS on Postharvest Techonology in the Global Market.* Acta Hort. 934, 387-391.
- Matos, O.C., Santos, M., Barreiro, M.G. 2008. Use of a new natural plant compound against post-harvest ‘Rocha’ pear rots. In: Almudi, R.O., Falcón, J.V., Mairal, A.F. (Eds.), *Avances en*

- maduración y post-recolección de frutas y hortalizas, Acribia, Zaragoza, 1-7.
- Matos, O.C., Barreiro, G. 2004. Safety use of bioactive products of plant origin for the control of post harvest fungal diseases of “Rocha” pear. In: *Maturação e Pós-Colheita 2004 - Frutos e Hortícolas*. M. Graça Barreiro/EANINIAP (Ed.), Oeiras, Portugal, 525-529.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Plant Biol.* 91, 6574-6578.
- Micheli, F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci* 6(9), 414-419.
- Miedes, E., Lorences, P.E. 2006. Changes in cell wall pectin and pectinase activity in apple and tomato fruits during *Penicillium expansum* infection. *J Sci Food Agric.* 86, 1359-1364.
- Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sci.* 84(4), 407–412.
- Mwaniki, M.W., Mathooko, F.M., Hiwasa, K., Tateishi, A., Yokotani, N., Ushijima, K., Naka, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2007. B-Galactosidase and α -L-arabinofuranosidase activities and gene expression in European and Chinese pear fruit during ripening. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76, 85–90.
- Mwaniki, M.W., Mathooko, F.M., Matsuaki, M., Hiwasa, K., Tateishi, A., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2005. Expression characteristics of seven members of the b-galactosidase gene family in ‘La France’ pear (*Pyrus communis* L.) fruit during growth and their regulation by 1-methylcyclopropene during postharvest ripening. *Postharvest Biol. Technol.* 36, 253-263.
- O’Brien, J.A., Daudi, A., Butt, V.S., Bolwell, G.P. 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236, 765–779.
- Pais, I., Ramos, P., Barreiro, M.G., Silva, M.J. 2008. Calcium and imazalil increased efficacy of *Aureobasidium pullulans* on blue mold of ‘Rocha’ pears. Effects on sugars. In: *Almudi, R.O., Falcón, J.V., Mairal, A.F. (Eds.), Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas, Acribia, Zaragoza, pp. 561-566.*
- Palou, L. 2013. Mini-review: Heat treatments for the control of citrus postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.)* 508-514.
- Palou, L. 2009. Control of citrus postharvest diseases by physical means. *Tree For. Sci. Bio.* 3(2), 127-142.

- Peng, X., Hu, Y., Tang, X., Zhou, P., Deng, X., Wang, H., Guo, Z. 2012. Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. *Plant*. 236(5), 1484-1498.
- Perrin, R., Wilkerson, C., Keegstra, K. 2001. Golgi enzymes that synthesize plant cell wall polysaccharides: finding and evaluating candidates in the genomic area. *Plant Mol. Biol.* 47, 115-130.
- Pinho, M. 2011. Aplicação de biofilmes de quitosano e de atmosfera modificada na conservação de pêra Rocha de 4ª Gama. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- Pisoschi, A.M., Cheregi, M.C., Danet, A.F. 2009. Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Mol.* 14, 480-493.
- Puhlmann, J., Bucheli, E., Swain, M.J., Dunning, N., Albersheim, P., Darvill, A.C., Hahn, M.C. 1994. Generation of Monoclonal Antibodies against Plant Cell-Wall Polysaccharides. *Plant Physiol.* 104, 699-710.
- Pressey, R. 1983. -galactosidase in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 71, 132–135.
- Reis, C. 2011. Insectos polinizadores e seu efeito na produção de Pereira ‘Rocha’ na Região Oeste. Dissertação de Mestrado, Instituto superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Reyes, L.F., Villarreal, J.M., Cisneros-Zevallos, L. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chem.* 101(3), 1254–1262.
- Rose, J.K.C., Braam, J., Fry, S.C., Nishitani, K. 2002. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiol.* 43, 1421-1435.
- Ross, G.S., Wegrzyn, T., MacRae, E.A., Redgwell, R.J. 1994. Apple β -Galactosidase: Activity against Cell Wall Polysaccharides and Characterization of a Related cDNA Clone. *Plant Physiol.* 106, 521-528.
- Sanhueza, R.M. 1993. Podridões de maçãs frigorificadas: guia para diagnóstico. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Uva e Vinho, Brasília, Embrapa, 20.
- Santos, P. 2009. Aplicação da espectroscopia de Infravermelho próximo na avaliação de alguns atributos de qualidade em pêra ‘Rocha’ e maçã ‘Gala’. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa, Portugal.
- Sanzani, S.M. Ippolito, A. 2011. State of the Art and Future Prospects of Alternative Control Means Against Postharvest Blue Mould of Apple: Exploiting the Induction of Resistance. *Fungicides - Beneficial and Harmful Aspects*, Dr. Nooruddin Thajuddin (Ed.), ISBN: 978-953-307-451-

- 1, InTech, DOI: 10.5772/26548. Available from: <http://www.intechopen.com/books/fungicides-beneficial-and-harmful-aspects/state-of-the-art-and-future-prospects-of-alternative-control-means-against-postharvest-blue-mould-of>
- Sasidharan, R., Voeselek, L.A, Pierik, R. 2011. Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 30(6), 548-562.
- Sattler, S.E., Funnell-Harris, D.L. 2013. Modifying lignin to improve bioenergy feed stocks: strengthening the barrier against pathogens? *Front. Plant Sci.* 4:70. doi:10.3389/fpls.2013.00070
- Schováňková, J., Opatová, H. 2011. Changes in phenols composition and activity of phenylalanine-ammonialyase in apples after fungal infections. *Hort. Sci.* 38, 1–10.
- Sekine, D., Munemura, I., Gao, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T. Murayama, H. 2006. Cloning of cDNAs encoding cell-wall hydrolases from pear (*Pyrus communis*) fruit and their involvement in fruit softening and development of melting texture. *Physiol. Plantarum* 126, 163-174.
- Shah, P., Powell, A.L.T., Orlando, R., Bergmann, C., Gutierrez-Sanchez, G. 2012. Proteomic Analysis of Ripening Tomato Fruit Infected by *Botrytis cinerea*. *J. Proteome Res.* 11, 2178-2192.
- Silva, G.J., Souza, T.M., Barbieri, R.L., Oliveira, A.C. 2014. Origin, Domestication, and Dispersing of Pear (*Pyrus* spp.). *Adv. Agri.* 8.
- Singh, Y., SUMBALI, G. 2008. Patulin and citrinin production in apple and pear fruits by *Penicillium expansum* strains collected from Jammu markets. *Indian Phytopath.* 61 (4), 471-477.
- Spêrandio, E.M. 2012. Ocorrência, diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas a plantas do cerrado. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Brasil.
- Su, J., Tu, K., Cheng, L., Tu, S., Wang, M., Xu, H., Zhan, G. 2011. Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit. *Post. Biol. Technol.* 62(1), 64–70.
- Sugar, D. 2002. Management of postharvest diseases. Chapter 9 in: Knee, M. (ed.). *Fruit Quality and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.
- Sugar, D., Powers, K. 1986. Interactions among fungi causing postharvest decay of pear. *Plant disease*, 70(12), 1132-1134.
- Swain, T., Hillis, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10, 63-68.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp:

- Tateishi, A., Mori, H., Watari, J., Nagashima, K., Yamaki, S., Inoue, H. 2005. Isolation, Characterization, and Cloning of a-L-Arabinofuranosidase Expressed during Fruit Ripening of Japanese Pear. *Plant Physiol.* 138, 1653–1664.
- Tavares, G.M. 2009. Podridão do pé do mamoeiro: Infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e trichoderma e avaliação dos mecanismos de defesa envolvidos. Dissertação de Doutorado, Departamento de Agronomia – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Terao, D., Oliveira, S.M.A., Viana, F.M.P., Saraiva, A.C.M. 2008. Estratégias de controlo de podridões em pós-colheita de melão: uma revisão. *Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos*, 112, 56.
- Tian, S., Wan, Y., Qin, G., Xu, Y. 2006. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 729–734.
- Tomás, C., Azevedo, V. 2013. Produto químico perigoso banido da pêra rocha. Acedido a 24 de Maio de 2014 em <http://expresso.sapo.pt/produto-quimico-perigoso-banido-da-pêra-rocha=f837707>
- Tosetti, R., Tardelli, F., Tadiello, A., Zaffalon, V., Giorgi, F.M., Guidi, L., Trainotti, L., Bonghi, C., Tonutti, P. 2014. Molecular and biochemical responses to wounding in mesocarp of ripe peach (*Prunus persica* L. Batsch) fruit. *Post. Biol. Technol.* 90, 40-51,
- Tripathi, A., Sharma, N., Sharma, V., Alam, A. 2013. A review on conventional and non-conventional methods to manage post-harvest diseases of perishables. *Res.* 5(6), 6-19.
- Van Sandt VS, Suslov D, Verbelen JP, Vissenberg K (2007) Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Ann Bo* 100:1467-1473. doi: 10.1093/aob/mcm248
- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Higgins, V.J., Blumwald, E. 1994. Plant defense response to fungal pathogens. Activation of hostplasma-membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant. Physiol.* 104, 209–215.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M.B., Garat, M.F., Wisniewski, M. 2009. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Bio. Sci. Tec.*, 19(10), 1033-1049.
- Villarreal, M.R. 2007. A section of the cell wall in a plant cell. Acedido a 24 de Setembro de 2014, em http://en.wikipedia.org/wiki/File:Plant_cell_wall_diagram.svg.
- Vilanova, L., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Buron-Moles, G., Teixido, N. 2014. Increasing maturity

- reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples. *Postharvest Biol. Technol.* 88, 54-60.
- Volpi, C., Janni, M., Lionetti, V., Bellincampi, D., Favaron, F., D'Ovidio, R. 2011. The ectopic expression of a pectin methyl esterase inhibitor increases pectin methyl esterification and limits fungal diseases in wheat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 1012–1019.
- Xu, L., Zhu, L.F., Tu, L.L., Liu, L.L., Yuan, D.J., Jin, L., Long, L., Zhang, X. 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahlia* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J. Exp. Bot.* 62, 5607–5621. doi:10.1093/jxb/err245 .
- Xu, X., Qin, G., Tian, S. 2008. Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. *Inter. J Food Micr*, 126, 153–158.
- Zalar P., Gostincar, C., de Hoog, G.S., Ursic, V., Sudhadham, M., Gunde-Cimerman, N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol.* 61, 21-38.
- Zhao, Y., Tu, K., Su, J., Tu, S., Hou, Y., Liu, F., Zou, X. 2009. Heat Treatment in Combination with Antagonistic Yeast Reduces Diseases and Elicits the Active Defense Responses in Harvested Cherry Tomato Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7565–7570.
- Yao, C., Conway, W.S., Sams, C.E. 1996. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. *Phytopathol.* 86, 1160-1166.
- Yu, J., Jurick, W.M., Cao, H., Yin, Y., Gaskins, V.L., Losada, L., Zafar, N., Kim, M., Bennett, J.W., Nierman, W.C. 2014. Draft genome sequence of *Penicillium expansum* strain R19, which causes postharvest decay of apple fruit. *Genome Announc.* 2(3):e00635-14.
- WAPA. . The World Apple and Pear Association. 2014. EU Commission market report on pears 2013. Acedido a 6 de Novembro de 2014 em <http://www.wapa-association.org/docs/2013/Tabpoir-24.pdf>.
- Wei, J., Qi, X., Jia, Y., Li, H., Ma, F., Gao, H. 2012. Changes of beta-galactosidase and alpha-L-arabinofuranosidase activity and gene expression in relation to fruit storability of Apple. *J. Food Agri- Env.* 10 (3,4), 157-161.
- Wu, Z., Burns, J.K. 2004. A b-galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of ‘Valencia’ orange (*Citrus sinensis*). *J. Exp. Bot.* 55(402), 1483–1490.