INFLUÊNCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* NA EXPRESSÃO GÊNICA DA
ENZIMA FENILALANINA AMÔNIA-LIASE E NO METABOLISMO
FENÓLICO DE TECIDOS DE SORGO (*Sorghum bicolor*)
PROTEGIDOS CONTRA *Colletotrichum sublineolum*

HÉLIO MITOSHI KAMIDA

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Dezembro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Kamida, Hélio Mitoshi

Influência de *Saccharomyces cerevisiae* na expressão gênica da enzima fenilalanina amônia-liase e no metabolismo fenólico de tecidos de sorgo (*Sorghum bicolor*) protegidos contra *Colletotrichum sublineolum* / Hélio Mitoshi Kamida. - - Piracicaba, 1998.

59 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Composto fenólico 2. Enzima ^{fenilalanina} amônia-liase 3. Expressão gênica 4. Fungo fitopatogênico 5. Levedura 6. Resistência a doença 7. Sorgo 8. Tecido vegetal 9. Variedade I. Título

CDD 633.174

Aos meus pais Tetuo e Yossie
que sempre me deram incentivo, carinho e compreensão
dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Sérgio F. Pascholati pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

A Dra. Cláudia M. Bellato pela colaboração nos experimentos referentes a Biologia Molecular.

A Dra. Siu Mui Tsai por ter permitido que fossem conduzidos os experimentos de Biologia Molecular em seus laboratórios no CENA/USP.

A amiga Célia R. Tremacoldi pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

A amiga Célia C. Malvas pelas valorosas “conversas moleculares”.

Aos amigos José Renato Stangarlin e Everaldo Piccinin pelo auxílio nos procedimentos de Laboratório e muita paciência.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de fitopatologia e em especial aos integrantes do laboratório de fisiologia do parasitismo pelo convívio e amizade: Andressa F. Rizzo, Fabiana V. Hoto, Kátia R. S. Estrada, Luciana di Ciero, Márcia C. Roncatto, Marilda Borges, Nelson A. Wulff, Robson di Piero e Thaís R. P. Pascholati.

Aos meus amigos Fábio Borgatto e Paulo Celso F. Mello pela amizade e compreensão.

Ao Dr. Alexandre Ferreira (EMBRAPA - Sete Lagoas/MG) pelo fornecimento das sementes de sorgo.

Ao Dr. Ralph L. Nicholson (EUA) pelo fornecimento do plasmídeo contendo o inserto da fenilalanina amônia liase de sorgo.

Ao técnico em informática do CENA, João Geraldo Brancalion pelo auxílio no “scaneamento” das fotos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização do Curso de Mestrado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Controle alternativo de doenças.....	3
2.1.1. Controle biológico.....	3
2.1.2. Indução de resistência.....	4
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
2.3. Compostos fenólicos e fenilalanina amônia-liase (FAL).....	7
2.4. Expressão gênica da FAL.....	8
2.5. <i>Colletotrichum sublineolum</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1. Hospedeiro.....	12
3.1.1. Obtenção dos mesocótilos.....	12
3.1.2. Obtenção das plantas.....	12
3.2. Patógeno.....	13
3.3. Levedura.....	13
3.4. Expressão gênica da FAL.....	13
3.4.1. Transformação do plasmídeo contendo o inserto da FAL.....	13
3.4.2. Integridade do DNA plasmidial.....	14
3.4.3. PCR para amplificação e marcação do DNA da FAL com digoxigenina - sonda.....	15
3.4.4. Preparação do material vegetal.....	16
3.4.5. Extração de RNA total.....	17

3.4.6. Integridade do RNA.....	18
3.4.7. Análise da expressão da FAL através de “Dot-Blot”.....	19
3.5. Influência de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no metabolismo fenólico.....	20
3.5.1. Preparação do material.....	20
3.5.2. Extração dos fenóis.....	21
3.5.3. Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Integridade do DNA plasmidial da FAL.....	22
4.2. PCR para obtenção da sonda.....	22
4.3. Extração de RNA total.....	22
4.4. Análise da expressão gênica da FAL.....	29
4.5. Acúmulo de compostos fenólicos totais.....	33
5. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	41
APÊNDICE.....	58

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Gel de eletroforese (1 = padrão DNA λ cortado com *Hind* III; 2 = plasmídeo digerido) indicando duas bandas na coluna 2, sendo que a 0.5 Kb corresponde ao inserto da FAL e a 2.67 Kb corresponde ao vetor pUC 19..... 24
- Figura 2. Produto da amplificação do gene fenilalanina amônia-liase. Coluna 1 refere-se ao padrão DNA λ cortado com *Hind* III e coluna 2 ao DNA da FAL amplificado (0.50 Kb)..... 25
- Figura 3. Integridade do RNA total (20 μ g) extraído de tecidos de sorgo: 1) Mesocótilos cv. Brandes: 1) testemunha; 2) *S. cerevisiae*; 3) *C. sublineolum*; 4) *S.c.+C.s.*; cv. Tx398B: 5) testemunha; 6) *S. cerevisiae*; 7) *C. sublineolum*; 8) *S.c.+C.s.*; Plantas 14 dias cv Brandes: 9) testemunha; 10) *S. cerevisiae*; 11) *C. sublineolum*; 12) *S.c.+C.s.* 28S e 18s indicam subunidades do RNA..... 27
- Figura 4. Integridade do RNA total (20 μ g) extraído de tecidos de sorgo: Plantas 14 dias cv. Tx398B: 13) testemunha; 14) *S. cerevisiae*; 15) *C. sublineolum*; 16) *S.c.+C.s.*; Folhas 30 dias cv. Brandes: 17) testemunha; 18) *S. cerevisiae*; 19) *C. sublineolum*; 20) *S.c.+C.s.*; cv. Tx398B: 21) testemunha; 22) *S. cerevisiae*; 23) *C. sublineolum*; 24) *S.c.+C.s.* 28S e 18S indicam subunidades do RNA..... 28
- Figura 5. Resultado da hibridização do RNA total extraídos de tecidos de sorgo com a sonda do DNA da FAL. *S.c.* = *S. cerevisiae*; *C.s.* = *C. sublineolum*; *S.c.+C.s.* = *S. cerevisiae* + *C. sublineolum*..... 31

- Figura 6. Acúmulo de compostos fenólicos totais em mesocótilos de sorgo (cv.Brandes), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições..... 34
- Figura 7. Acúmulo de compostos fenólicos totais em mesocótilos de sorgo (cv.Tx398B), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições..... 35
- Figura 8. Acúmulo de compostos fenólicos totais em plantas de sorgo com 14 dias de idade (cv. Brandes), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições..... 36
- Figura 9. Acúmulo de compostos fenólicos totais em plantas de sorgo com 14 dias de idade (cv.Tx398B), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições..... 37
- Figura 10. Acúmulo de compostos fenólicos totais em folhas de sorgo com 30 dias de idade (cv. Brandes), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições..... 38
- Figura 11. Acúmulo de compostos fenólicos totais em folhas de sorgo com 30 dias de idade (cv.Tx398B), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições..... 39

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Quantidade de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) extraído de tecidos de sorgo..... 26

Tabela 2. Reações diferenciais da hibridização DNA:RNA, com base na Figura 5..... 32

INFLUÊNCIA DE *Saccharomyces cerevisiae* NA EXPRESSÃO GÊNICA DA
ENZIMA FENILALANINA AMÔNIA-LIASE E NO METABOLISMO
FENÓLICO DE TECIDOS DE SORGO (*Sorghum bicolor*)
PROTEGIDOS CONTRA *Colletotrichum sublineolum*

Autor: HÉLIO MITOSHI KAMIDA

Orientador: Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

A possibilidade da proteção de plantas de sorgo contra fungos fitopatogênicos por diferentes preparações obtidas a partir de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um não patógeno, tem sido demonstrada nos últimos anos por vários pesquisadores. Aparentemente, a proteção pode ocorrer por indução de resistência ou por ação da levedura como agente de controle biológico. Contudo, os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que são ativados nas plantas durante o fenômeno de proteção não estão esclarecidos. Foram utilizados dois cultivares de sorgo, sendo um resistente ao *Colletotrichum sublineolum* (cv. Brandes) e outro suscetível (cv. Tx398B). Mesocótilos, plantas com 14 dias e folhas com 30 dias foram tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum* e avaliados quanto aos parâmetros de expressão gênica da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) e o acúmulo de compostos fenólicos totais. Os resultados obtidos evidenciaram que *C. sublineolum* induziu o tecido resistente a expressar os genes desta enzima em plantas com 14 dias e folhas de sorgo com 30 dias e também foi responsável pelo acúmulo de compostos fenólicos no decorrer do tempo em mesocótilos. Por sua vez,

S. cerevisiae não induziu a expressão gênica da FAL em tecidos de sorgo, bem como não alterou o acúmulo de compostos fenólicos nos mesocótilos. Dessa maneira, a proteção de plantas de sorgo contra fitopatógenos por *S. cerevisiae* pode envolver outros passos do metabolismo fenólico.

INFLUENCE OF *Saccharomyces cerevisiae* IN THE GENE EXPRESSION OF
PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE AND PHENOLIC METABOLISM OF
SORGHUM TISSUES (*Sorghum bicolor*) PROTECTED
AGAINST *Colletotrichum sublineolum*

Author: HÉLIO MITOSHI KAMIDA

Adviser: Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

The protection of sorghum plants against plant pathogenic fungi with different preparations obtained from *Saccharomyces cerevisiae*, a non pathogen, has been demonstrated during the last years. Apparently, the protection is due to resistance induction and on the yeast action as a biological control agent. However, the physiological and biochemical aspects of the protection are not well known. In this study, two sorghum cultivars, one resistant to *Colletotrichum sublineolum* (cv. Brandes) and one susceptible (cv. Tx398B) were used. Mesocotyl tissues, plants 14 days-old and leaves 30 days-old were treated with water, *S. cerevisiae* or *C. sublineolum*, and the gene expression of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and the accumulation of phenolic compounds were evaluated. The results obtained showed that *C. sublineolum* induced the resistant tissue to express PAL genes in sorghum plants 14 days-old and leaves 30 days-old and also the accumulation of phenolic compounds in mesocotyls. However, *S. cerevisiae* did not induce the gene expression of PAL in sorghum tissues, and the accumulation of phenolic compounds in mesocotyls. Thus, the protection of sorghum plants against plant pathogens with *S. cerevisiae* seems to involve other steps from phenolic metabolism.

1. INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) encontra-se entre os cinco cereais mais consumidos no mundo (F.A.O., 1990). Pode ser cultivado para a produção de grãos, destinando-se principalmente à substituição do milho na alimentação humana e ração animal, ou de forragem para o gado e de álcool com finalidade combustível. No Brasil, embora a cultura de sorgo granífero (introduzida no século XVIII) seja relativamente recente - tem se tornado cada vez mais relevante em nosso meio (Fernandes, 1981; I.B.G.E., 1989). Atualmente, o sorgo vem sendo cultivado de norte a sul, destacando-se os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Bahia, Ceará e Pernambuco. Devido a sua perfeita adaptação às extensas e diversas áreas do país, e também por ser uma cultura totalmente mecanizável, o sorgo pode substituir o milho em regiões consideradas inadequadas para o cultivo deste último. Entretanto, se por um lado a produção de sorgo no Brasil tem crescido significativamente nas duas últimas décadas, por outro lado, a própria expansão, através da importação de sementes, permitiu que a maior parte das doenças, principalmente as de natureza fúngica, fossem aqui introduzidas.

Uma das formas de controle utilizada para doenças consiste no uso de fungicidas. Algumas de suas desvantagens envolvem seus altos custos (SÃO PAULO/SAA/CPA, 1988; White, 1983), bem como problemas de poluição ambiental e a possibilidade do aparecimento de raças resistentes do patógeno à fungicidas (Kimati, 1987; Staub & Sozzi, 1984). A indução de resistência e o controle biológico são métodos alternativos de controle de doenças de plantas, com potencial de minimizar o alto custo, o aumento da resistência dos fitopatógenos e o impacto sobre o ambiente causado pelos produtos químicos (Bettiol, 1991).

Vários trabalhos indicam o potencial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na ativação de mecanismos de resistência e na proteção de plantas contra fitopatógenos (Lopez & Pascholati, 1991; Martins, 1991; Martins et al., 1986; Roverati, 1989). Obviamente, a indução de resistência pela ação do agente biótico *S. cerevisiae* envolve alterações fisiológicas e bioquímicas do hospedeiro. Assim, o presente trabalho procurou estudar dois aspectos do metabolismo de tecidos de sorgo em resposta ao tratamento com a levedura: a) a expressão gênica da enzima fenilalanina amônia-liase e b) o acúmulo de compostos fenólicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Controle alternativo de doenças

São medidas que não englobam o controle químico clássico e o melhoramento genético de plantas para resistência às doenças, portanto, envolvendo o controle biológico e a indução de resistência em plantas (Pascholati, 1998).

2.1.1. Controle Biológico

Controle biológico de doenças de plantas consiste no uso de microrganismos antagonistas para os mais variados patógenos. Cook & Baker (1983) definiram este termo como a redução do potencial de inóculo e ou patogenicidade, pelo uso de um ou mais organismos, exceto o homem. Os mecanismos de ação dos agentes de biocontrole baseiam-se em cinco princípios básicos: antibiose, parasitismo, competição, predação e hipovirulência. A antibiose baseia-se na produção de substâncias com efeito fungicida ou fungistática, bactericida e nematicida. Estas substâncias, por sua vez, são produzidas pelos organismos antagonistas como um mecanismo de proteção à sobrevivência de um organismo em função dos demais microrganismos existentes na microflora que ocupa (Luz, 1993). Como exemplo de organismo antagonista, podemos citar fungos do gênero *Trichoderma* spp, que produzem antibióticos de vários tipos. Porém, nem todas as espécies do fungo têm ação de antibiose, pois utilizam outros mecanismos no biocontrole das doenças de plantas (Baker, 1994; Sanhueza, 1991).

O mecanismo de parasitismo ou hiperparasitismo por microrganismos consiste na degradação da parede celular ou estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos, com posterior penetração no fungo e absorção do conteúdo celular (Chet, 1987; Chet et al., 1990).

O fenômeno do controle biológico através da competição envolve principalmente a disputa por nutrientes e espaço. A velocidade de crescimento, bem como a eficiência na absorção de determinadas formas de carbono, nitrogênio e outros nutrientes minerais determina a sobrevivência dos microrganismos em alguns ambientes, assim como a sucessão de populações (Paulitz, 1990; Campbell, 1994). Na predação, um organismo, o predador, se alimenta de um outro, a presa, basicamente obtendo nutrientes orgânicos do último através da ingestão e levando o mesmo a morte (Agrios, 1997). Finalmente, no caso da hipovirulência, como mecanismo nas interações antagonista - fitopatógenos, refere-se a presença de uma linhagem do patógeno menos agressiva ou não patogênica, que pode transmitir essa característica para as linhagens patogênicas (Van Driesche & Bellows Júnior, 1996).

2.1.2. Indução de resistência

O tratamento prévio de plantas, a fim de conferir proteção pela ativação dos mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos das plantas, protegendo-as contra fungos, vírus e bactérias é conhecido como indução de resistência (Madamanchi & Kuc, 1991; Martinelli, 1992; Martins, 1991; Moraes, 1991; Pascholati et al., 1986; Pascholati & Leite, 1994; 1995).

Como regra geral na natureza, cada espécie vegetal possui mecanismos eficientes que impedem o estabelecimento e o desenvolvimento da maioria dos organismos patogênicos, porém, alguns conseguem vencer as defesas da planta e ocasionar doença. Deste modo, resulta o conceito de que a resistência é a regra e a susceptibilidade uma exceção (Moraes, 1991; Lopez, 1992; Pascholati & Leite, 1994).

Quando o sistema de defesa da planta mostra-se ineficiente ou inoperante, o patógeno tem condições de iniciar o processo infeccioso e instalar-se nos tecidos do

hospedeiro, resultando em distúrbios ao nível fisiológico e bioquímico, que levam ao surgimento dos sintomas da doença (Leite & Pascholati, 1995; Moraes, 1991).

A resistência de um hospedeiro, dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (Pascholati & Leite, 1995). Neste sentido, as plantas apresentam diversos mecanismos de resistência que são divididos didaticamente em duas categorias: a) mecanismos pré-formados (passivos, constitutivos), que são subdivididos ainda em estruturais (por exemplo: cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores, etc) e bioquímicos (por exemplo: fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos, glicosídeos fenólicos, fototoxinas, inibidores proteicos, β -1,3 glucanase, quitinase, etc) e b) mecanismos pós-formados (ativos; induzíveis), que também são subdivididos em estruturais (por exemplo: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tilose, etc) e bioquímicos (por exemplo: fitoalexinas) (Moraes, 1991; Bell, 1981; Isaac, 1992; Mansfield, 1983; Aist, 1983; Pascholati & Leite, 1994).

De modo geral, a indução de resistência em plantas está relacionada a mecanismos estruturais e bioquímicos pós-formados. Os mecanismos pré-formados podem ser considerados também como passíveis de serem induzidos, pois como resultado da infecção as substâncias já existentes podem ser convertidas em outras substâncias altamente tóxicas aos fitopatógenos, ou ainda podem ter seu acúmulo aumentado rapidamente em resposta a uma possível agressão externa (Pascholati & Leite, 1994).

Para que o processo de indução de resistência seja desencadeado é necessário que ocorra algum estímulo na planta hospedeira para que os mecanismos latentes de resistência da planta sejam ativados (Pascholati & Leite, 1995). Os agentes capazes de provocar este estímulo nas plantas são chamados de indutores ou elicitores, os quais podem ser divididos em bióticos e abióticos. Os elicitores bióticos são representados por microrganismos saprófitas, pelo próprio patógeno ou por patógeno de outras culturas, onde os mesmos podem estar na forma virulenta, avirulenta ou inativada. Também podem englobar metabólitos microbianos e extratos de plantas sadias ou imunizadas (Sequeira,

1979; Kuc & Rusch, 1985; Duke et al., 1987; Moraes, 1989; 1990). A maioria dos pesquisadores prefere o uso de não patógenos para as investigações sobre a indução de resistência em plantas. No Brasil, alguns dos microrganismos comumente utilizados são *Bacillus thuringiensis* e *Saccharomyces cerevisiae*, devido as facilidades encontradas na aquisição de formulações comerciais, além dos resultados já obtidos com os mesmos serem promissores (Freitas et al., 1993; Lopez, 1991; Moraes, 1991; Roncatto & Pascholati, 1993; Roveratti, 1989; Da Silva & Pascholati, 1992; Stangarlin & Pascholati, 1994).

Os mais variados tipos de elicitores abióticos são utilizados no estudo do fenômeno de indução de proteção. Dentre eles, temos: luz ultra-violeta, injúria mecânica com carborundum, tratamento com HgCl_2 , NaCl e nitrogênio líquido (Freitas et al., 1993; Pascholati & Leite, 1995). Hadwiger et al. (1994) relataram a quitosana como um produto muito promissor no controle de fitopatógenos.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Vários trabalhos realizados demonstraram o efeito de suspensões de células dessa levedura bem como do filtrado dessas suspensões na proteção de plantas de sorgo contra *Colletotrichum sublineolum* e plantas de milho contra *Colletotrichum graminicola* e *Exserohilum turcicum*, sob condições de laboratório e casa-de-vegetação (Da Silva & Pascholati, 1992; Lopez, 1991; Stangarlin et al., 1991; Stangarlin & Pascholati, 1994). No caso específico de sorgo em relação a *C. sublineolum*, o fenômeno da proteção também foi evidenciado sob condições de campo, mostrando-se eficiente na redução da severidade da doença em folhas, assegurando uma produção de grãos equiparável ao uso de fungicida (Lopez, 1991; Piccinin, 1995). Reglinski et al. (1994) utilizaram extrato de parede celular desta levedura para induzir resistência em cevada. Recentemente, Pascholati (1998) elaborou uma revisão sobre o potencial de *S. cerevisiae* na proteção de plantas contra fitopatógenos.

2.3. Compostos fenólicos e fenilalanina amônia-liase

Compostos fenólicos são substâncias caracterizadas pela presença de um anel aromático contendo no mínimo um grupo hidroxila ou seu derivado funcional (Egger, 1969; Ribéreau-Gayon, 1972). Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosídeos, ácidos fenol-carboxílicos derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, α -pironas (coumarinas e isocoumarinas), ligninas, flavonóides (flavonóis, flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas. Em geral, tendem a ser solúveis em água, uma vez que ocorrem frequentemente combinados com carboidratos e são localizados usualmente nos vacúolos celulares (Harborne, 1989).

Os fenóis podem ser sintetizados ao longo de três diferentes vias metabólicas: via do ácido shiquímico, via do acetato-malonato e via do acetato-mevalonato. No entanto, a via mais importante em plantas superiores é a que envolve o ácido shiquímico. Essa via é uma importante fonte de compostos fenólicos e também dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina são enzimaticamente deaminados produzindo o ácido *trans*-cinâmico e seus derivados, através de uma sequência de reações de hidroxilação-metilação. As reações são catalisadas por um sistema multienzimático capaz de remover os elementos de amônia da fenilalanina e tirosina com a formação dos ácidos *trans*-cinâmico e *p*-cumárico. Estas enzimas são as amonialiasas e no caso da fenilalanina a enzima é denominada de fenilalanina amônia-liase (FAL) (Camm & Towers, 1977).

A FAL é uma enzima do metabolismo secundário intensivamente estudada em plantas (Gross, 1980) devido a sua importância nas reações do metabolismo fenólico (Camm & Towers, 1977). Os mesmos fatores que influem na atividade da FAL, influem também na biossíntese de compostos fenólicos, havendo correlação entre a atividade da enzima e a produção de ácidos fenólicos livres, ésteres fenólicos, flavonóides, lignina e fitoalexinas (Gebale & Galston, 1983; Salunkhe & Sharma, 1991).

A atividade da FAL tem sido estudada em interações planta-patógeno envolvendo vírus (Vegetti et al., 1975), bactéria (Puroshothaman, 1974), nematóides (Chylinska & Knypl, 1975) e fungos. Os trabalhos com fungos representam a maioria: (Biehn et al.,

1968; Friend et al., 1971; Green et al., 1975; Hadwiger et al., 1970; Loschke et al., 1981; Narayanaswamy, 1980; Pascholati et al., 1985, 1986; Rahe et al., 1969; Tena & Valbuena, 1983).

Já há algum tempo, sabe-se que o principal papel dos fenóis nas plantas é a proteção contra doenças causadas por fungos, bactérias e vírus (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). A razão para esse papel baseia-se no fato de que muitos compostos fenólicos possuem atividade antimicrobiana *in vitro*. Os fenóis são de ocorrência generalizada nas plantas e normalmente ocorre um aumento na síntese desses compostos nas plantas após a infecção por um patógeno. No caso dos fungos, a toxicidade de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção de enzimas varia entre os diferentes grupos de fenóis (Nicholson & Hammerschmidt, 1992). Os compostos fenólicos são capazes de inativar enzimas celulolíticas e pectolíticas, produzidas por patógenos e envolvidas na degradação da parede celular das plantas (Martin & Grossman, 1972). A dissolução da parede celular é muito importante durante a infecção de patógenos biotróficos e necrotróficos. Nos fungos biotróficos, a penetração da parede celular e os danos ao hospedeiro são limitados. Para os patógenos necrotróficos, há colonização dos tecidos e morte das células.

2.4. Expressão gênica da fenilalanina amônia-liase

O DNA é a molécula que armazena as informações genéticas necessárias para o desenvolvimento e diferenciação celulares. Essas informações são armazenadas nos genes, que a nível molecular podem ser definidos como o conjunto de todas as sequências de DNA necessárias para produzir uma molécula de RNA ou um polipeptídeo funcional. O RNA pode ser encontrado nas células sob três formas, estrutural e funcionalmente distintas: RNA mensageiro (mRNA), RNA ribossômico (rRNA) e RNA transportador (tRNA). Os mRNAs participam na transferência da informação genética para os locais de síntese protéica. Os rRNAs e tRNAs estão envolvidos diretamente no processo de síntese de proteínas, como constituintes dos ribossomos e transportando aminoácidos para os

sítios de incorporação aos polipeptídeos em síntese, respectivamente. Pode-se dizer que um gene está se expressando quando ele está sendo transcrito em RNA. Com exceção dos genes codificando rRNAs e tRNAs, os demais genes são transcritos em mRNAs (Lambais, 1995).

Alterações na atividade da enzima FAL tem sido mostrado como um elemento chave que controla a síntese de fenilpropanóides e o aumento na quantidade de mRNA da FAL, conseqüentemente, está relacionado com a atividade desta enzima (Edwards et al., 1885; Fritzemeier et al., 1987; Lawton & Lamb, 1987; Orr et al., 1993).

Em mesocótilos de sorgo, ocorre o aumento da expressão dos genes que codificam a FAL após a inoculação com o fungo não patogênico *Cochliobolus heterostrophus* (Lo & Nicholson, 1998). Através desta interação, verifica-se a síntese de fitoalexinas e a repressão de genes que codificam a antocianina cianidina 3-dimalonil glicosidase, sendo que as antocianinas constituem um tipo de pigmento que tem por função atrair animais para polinização e proteção contra raios ultravioleta. Sugere-se então, que a planta reprime atividades metabólicas menos essenciais, como meio de compensar as respostas fisiológicas e bioquímicas imediatas de defesa (Lo & Nicholson, 1998).

A ativação da via metabólica de resposta de defesa geralmente pode ser detectada pela verificação do acúmulo de mRNA das enzimas chalcone sintase (CHS) e FAL ou pela quantificação da atividade destas duas enzimas, após a inoculação com microrganismos (Kuhn et al., 1984). Em mesocótilos estiolados de sorgo foi verificado que transcritos de RNA da FAL são acumulados em altos níveis sob condições de luz quando comparados àqueles submetidos a condições de escuro após serem inoculados com *C. sublineolum*. Já os transcritos de RNA da CHS são acumulados após a respectiva inoculação e independem da condição de luminosidade (Weiergang et al., 1996).

Em fumo (*Nicotiana tabacum*), análises realizadas pela técnica molecular de “Southern-blot” indicaram que a FAL é codificada por uma pequena família de 2 a 4 genes. Análises realizadas por “Northern-blot” mostraram que os genes da FAL praticamente não são expressos sob condições fisiológicas normais, porém são expressos

de forma moderada e passageira após ferimento, e fortemente induzidos durante a reação de hipersensibilidade causada por TMV (“Tobacco Mosaic Virus”) ou por um elicitor fúngico (Pellegrini et al., 1994).

Cui et al. (1996) realizaram estudos com plântulas de sorgo e verificaram que os tecidos do tratamento controle (sem inoculação) apresentaram baixos níveis de transcritos de mRNA da FAL, mas um rápido acúmulo foi verificado após a inoculação com o patógeno de milho *Bipolaris maydis*. Após 120 h da inoculação houve um decréscimo na quantidade de mRNA.

De acordo com o trabalho de Orczyk et al. (1996), no qual o material de estudo foi representado por mesocótilos de sorgo oriundos de cultivares que diferenciavam-se na habilidade de sintetizar antocianina em resposta a luz, foi observado a indução da FAL, assim como pela infecção por um fungo, através da hibridização com sonda marcada de RNA para esta enzima. O cultivar que não exibia a capacidade de sintetizar antocianina em resposta a luz apresentou um acúmulo de RNA logo nas primeiras horas de coleta, porém um decréscimo foi observado pouco tempo depois; entretanto, quando o mesmo cultivar foi inoculado com o não patógeno *Bipolaris maydis*, a intensidade de transcritos de RNA da FAL intensificou-se significativamente 24 h após a inoculação.

2.5. *Colletotrichum sublineolum*

A doença causada por este patógeno é denominada antracnose, no Brasil. Essa doença foi relatada pela primeira vez em São Paulo, em 1943, em *Sorghum* sp. É a doença mais importante dessa cultura pela sua ampla distribuição geográfica e pelos danos que ocasiona, constituindo-se, inclusive, em sério fator limitante da produção (Panizzi & Fernandes, 1997).

O patógeno caracteriza-se por afetar folhas, caule, haste floral, flores e sementes de sorgo em qualquer estágio fenológico. Sintomas nas folhas iniciam-se por pequenas lesões circulares ou elípticas de coloração arroxeada que coalescem, atingindo grandes áreas do limbo foliar. Os centros das lesões adquirem tonalidade palha com o envelhecimento, e os sintomas de necrose foliar avançam até ocasionarem a seca das

folhas afetadas (Frederiksen, 1991). Sintomas apresentados pelas flores ou grãos são muito severos, afetando assim diretamente a produção, prejudicando a qualidade de grãos ou sementes (Cardwell, 1989; Lasca et al., 1986).

Através da análise da sequência de rDNA, foi verificado que existe uma distinção entre *Colletotrichum graminicola* isolado de sorgo, do isolado de milho, assim, é conveniente denominar como *C. sublineolum* o agente causal da antracnose em sorgo (Sherriff et al., 1995). A sua fase perfeita corresponde a *Glomerella graminicola* (Frederiksen, 1991; Nicholson, 1992). Os conídios são produzidos em associação com uma matriz mucilaginosa solúvel em água, a qual consiste de uma mistura complexa incluindo enzimas, glicoproteínas, carboidratos e alguns compostos de baixo peso molecular. A matriz mostra-se envolvida na proteção dos conídios contra dissecação, compostos fenólicos e no estabelecimento da infecção no hospedeiro, sendo, portanto, necessária para a sobrevivência e patogenicidade (Nicholson & Moraes, 1980; Leite, 1992).

Condições ideais para que ocorra a penetração do fungo envolvem temperaturas na faixa de 22 a 30°C, umidade relativa superior a 90% e a presença de água livre (Frederiksen, 1991; Leonard & Thompson, 1976; Nicholson & Warren, 1976; Nicholson, 1992). A disseminação do patógeno é realizada principalmente através de sementes infectadas, as quais podem levar o patógeno à grandes distâncias e novas áreas geográficas (Cardwell, 1989; Chaudhary & Mathur, 1979; Siddiqui et al, 1983; Prasad et al., 1985; Lasca et al, 1986). Por sua vez, a disseminação do patógeno de uma planta para outra, dentro de uma mesma cultura ou culturas próximas, ocorre principalmente devido as condições de alta umidade relativa, em geral chuvas, que solubilizam a matriz mucilaginosa. Quando as chuvas são acompanhadas de vento, a disseminação torna-se mais eficiente à maiores distâncias (Amorin, 1995; Nicholson, 1992; Frederiksen, 1991). A sobrevivência do patógeno de um ano para outro ocorre geralmente pela presença de plantas de sorgo remanescentes e infectadas, plantas daninhas hospedeiras ou restos de cultura infectadas (Frederiksen, 1991; Lipps, 1983).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Hospedeiro

3.1.1. Obtenção dos mesocótilos

Mesocótilos estiolados de sorgo foram produzidos segundo a técnica descrita por Heim et al. (1983). Sementes de sorgo dos cultivares Brandes e Tx398B foram previamente mergulhadas em solução água-álcool (1:1) durante 2 min e em solução aquosa de hipoclorito de sódio (2:3) por 10 min. Estas foram embebidas em água destilada, sob aeração. Após 4 horas, as sementes foram colocadas para germinar entre camadas de papel de germinação umedecidas e incubadas no escuro a 28 °C. O material foi mantido nessas condições até o mesocótilo atingir um tamanho aproximado de 40mm (+/- 5 dias após a semeadura em papel).

3.1.2. Obtenção das plantas

As sementes dos cultivares de sorgo Brandes e Tx398B foram colocadas em solo composto (terra-areia, 3:1; v/v) autoclavado (2h, 120 °C, 1 atm), mantido no interior de vasos de metal de 2,5 litros e sob condições ambientais de casa-de-vegetação. As sementes utilizadas foram previamente mergulhadas em solução água-álcool (1:1, v/v) durante 2 min e em solução aquosa de hipoclorito de sódio (2:3; v/v) por 10 min. Antes da semeadura. O excesso de desinfetante foi retirado por rinsagem em água destilada.

3.2. Patógeno

Colletotrichum sublineolum foi isolado a partir de lesões de folha de sorgo infectada naturalmente e que se encontravam no campo experimental do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP. Este fungo foi cultivado em placas de Petri com meio de aveia, sob luz próxima ao ultravioleta (NUV) à temperatura de aproximadamente 21 °C. Após 14 dias, suspensões de conídios dos fungos citados foram obtidas acrescentando-se água destilada estéril (contendo Tween 20 a 0,1%) às culturas esporulantes (Thakur et al., 1989). A seguir com uma alça de vidro, a superfície das colônias foi raspada para a obtenção dos conídios e o material obtido foi filtrado através de gaze, sendo o número de conídios/mL calculado pelo uso de um hematocítômetro (Pedersen et al., 1986).

3.3. Levedura

A suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen foi obtida a partir da dissolução do produto comercial “Fermento Biológico Fleischmann” (Fleischmann & Royal do Brasil, Jundiaí, SP) e que posteriormente foi repicada e mantida em meio de BDA (batata-dextrose-ágar), sob condições de luz fluorescente constante, a 25 °C por aproximadamente 2 dias.

3.4. Expressão gênica da fenilalanina amônia-liase (FAL)

3.4.1. Transformação do plasmídeo contendo o inserto da FAL

O plasmídeo contendo o inserto do gene FAL foi gentileza do Prof. Dr. Ralph L. Nicholson da Universidade de Purdue (EUA). O inserto foi proveniente de *Sorghum bicolor* e tem um tamanho aproximado de 500 pb, clonado em pUC 19 (Cui et al., 1996).

Uma alíquota de 3 µL de plasmídeo foi misturada a 200 µL de células competentes (*E. coli* DH5α) em tubos tipo Eppendorf, o qual foi mantido por 30 min em banho de gelo picado e posteriormente submetido a 42 °C durante 2 min. Após, adicionou-se 500 µL de meio LB (0,5 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 10 g de tripton; 15 g de ágar; 1000 mL de água), sendo o material incubado em banho a 37 °C

por 1 hora. Aliquotas de 50 μ L, 100 μ L e 200 μ L foram plaqueadas em meio de cultura LB contendo carbinicilina na concentração de 100 μ g/mL. As placas foram mantidas em estufas a 37 °C durante 12 horas. Após este período, retirou-se uma colônia, (procedente da placa de concentração 50 μ L) a qual foi colocada em 5 mL de meio LB, contendo 10 μ L de carbinicilina (concentração de 100 μ g/mL). A solução foi mantida sob agitação a 37 °C durante 12 horas. A seguir, uma alíquota de 1,5 mL do crescimento bacteriano foi transferida para um tubo do tipo Eppendorf (da mesma capacidade), seguido de centrifugação (8.000g) por 10min. Após, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de Solução I (glicose 50mM; EDTA 10mM; Tris-HCl 25mM pH 8,0) e posteriormente adicionou-se 200 μ L da Solução II (2,5 mL de H₂O deionizada; 50 μ L de NaOH; 125 μ L de SDS 20%). O tubo Eppendorf foi mantido em gelo durante 10 min, sendo que após este período adicionou-se 150 μ L da Solução III (60 mL de acetato de potássio 5M; 11,5 mL de ácido acético glacial; 28,5 mL de água). O tubo foi mantido em gelo por 10 min e em seguida submetido a centrifugação (8.000g).

Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e adicionou-se ½ volume de fenol equilibrado com tampão TE (Tris 0,2M; EDTA 5mM pH 8,3) + ½ volume de clorofórmio. Misturou-se bem a solução a qual foi centrifugada (8.000g) por 5 min. Após, transferiu-se o sobrenadante para novo tubo e repetiu-se a operação por mais uma vez. Em seguida, adicionou-se clorofórmio na proporção de 1 volume, agitou-se, centrifugou-se (8.000g) e transferiu-se o sobrenadante para novo tubo. Após, adicionou-se 2,5 volume de etanol absoluto gelado e submeteu-se o tubo a temperatura de -80 °C durante 2 h. Logo após, precipitou-se o DNA plasmidial durante 20 min. Finalmente, o precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 50 μ L de água milliQ esterilizada.

3.4.2. Integridade do DNA plasmidial

A integridade do DNA plasmidial foi observada através de eletroforese em gel de 0,9% de agarose em solução TAE (Tris 0,2M; ácido acético; EDTA 5mM pH 8,0),

contendo 3 μL de brometo de etídio (concentração de $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Aliquota de 1 μL de corante (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol; 15% ficoll 400) foi adicionado a 5 μL de DNA, sendo estes misturados e posteriormente colocados no interior da canaleta do gel. A corrida de eletroforese foi realizada à 60V durante 2 h. O padrão de peso molecular utilizado foi o DNA λ cortado com *Hind* III.

Para a confirmação da presença do inserto da FAL no vetor pUC19 houve a necessidade da digestão do DNA com as enzimas *Eco*RI e *Xba*I, a qual foi realizada em duas etapas. Para a “digestão” com a primeira enzima foram misturadas a 15 μL de DNA, 19 μL de água, 1 μL *Eco*RI (5U/ μL), 4 μL tampão e 1 μL de RNase (concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A mistura foi incubada a 37 °C durante aproximadamente 5 h. A seguir, adicionou-se 1/10v de acetato de sódio (3M pH 5.2) e 200 μL de etanol absoluto. A solução foi submetida a -20 °C durante 12 horas. Após este período, a mistura foi centrifugada (8.000 g) durante 20 min, o sobrenadante descartado, lavado com etanol 70% e o precipitado ressuspenso em 35 μL de água. Para a digestão com a segunda enzima, adicionou-se a este volume, 1 μL de *Xba*I (5U/ μL) e 4 μL de tampão, sendo a mistura incubada a 37 °C. Após um período de 2 h, retirou-se uma alíquota de 12 μL e adicionou-se a esta 2 μL de corante, realizou-se a corrida em gel de agarose 0,9% contendo 3 μL de brometo de etídio. A integridade do DNA plasmidial foi verificada com o auxílio de transiluminador (luz UV).

3.4.3. PCR para amplificação e marcação do DNA da FAL com digoxigenina - sonda

As reações de PCR (reação em cadeia de polimerase) foram efetuadas em termociclador GENE AMP 480 (Perkin Elmer), com volume final de 50 μL contendo 100 ng/ μL de DNA, 18,5 μL de água MilliQ esterilizada, 0,2 μM de “primer” 40 (5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-G-(T) M13 -20 - Stratagene), 0,2 μM de “primer” 41 (5'-GGA-AAC-AGC-TAT-GAC-CAT-(G)-3' M13 Reverse - Stratagene), 1U de Taq DNA polimerase (Gibco BRL-5U/ μL), 1X de tampão recomendado pelo fabricante da enzima, 100 μM de cada dNTP, 10 μM de dUTP Dig (concentração final 10 μM / DIG-11-dUTP

Boehringer Mannheim Biochemicals) e 1,5 mM de $MgCl_2$. A amostra foi submetida a desnaturação inicial a 94 °C por 6 min, seguida de 2 ciclos de 94 °C por 1 min, 30 °C por 2 min e 72 °C por 2 min e 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 2 min e 72 °C por 2 min. Ao final, seguiu-se uma extensão de 72 °C por 4 min.

Uma alíquota de 3 μ L da amplificação da amostra com a adição de 0,5 μ L de corante foi resolvida em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (0,5g/mL de gel) usando tampão TBE 1X (tris 800mM; ácido bórico 800mM; EDTA 20mM) e fotografado com máquina polaróide sob luz UV.

O produto foi removido do gel de agarose com um bisturi, colocada em tubo do tipo Eppendorf e adicionado ao fragmento de gel 1 mL de tampão “Big Squeeze Elution” (acetato de sódio 0,3M; EDTA 1mM pH 7,0), agitou-se o Eppendorf por 4 min, o qual foi submetido a 60 °C em banho-maria por 15 min sendo em seguida imerso em nitrogênio líquido. Posteriormente, o material foi centrifugado (8.000 x g) durante 15 min e o sobrenadante foi transferido para Eppendorf. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 100% e 1/10V com acetato de sódio por 12 horas. Após este período, o precipitado foi lavado em etanol 80% e ressuspensão em 25 μ L de água MilliQ esterilizada.

3.4.4. Preparação do material vegetal

O material de sorgo foi representado por mesocótilos, os quais foram obtidos segundo o item 3.1.1. Plântulas inteiras com 14 dias e folhas de plântulas com 30 dias de idade foram obtidas de acordo com o item 3.1.2.

Suspensões de células de *S. cerevisiae* crescidas em meio BDA, foram obtidas pela adição de água destilada sobre o meio contendo a levedura. As concentrações das suspensões de células utilizadas foram ajustadas para 1×10^8 células/mL. As suspensões foram aspergidas sobre o tecido vegetal, com o auxílio de um aspersor manual. Em um dos tratamentos, efetuou-se a aspersão de suspensão de conídios de *C. sublineolum*, obtida conforme o item 3.2. Em outro tratamento, foram aspergidas suspensões de células de *S. cerevisiae* seguidas logo após da aspersão de suspensão de conídios de *C.*

sublineolum. Como testemunha, o material vegetal utilizado foi aspergido com água destilada contendo Tween 20 (0,1%). O material foi colocado em câmara úmida, à aproximadamente 28 °C, sob fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. A coleta das amostras, para a extração de RNA total, foi realizada 36 h após os tratamentos citados. Estas foram colocadas no interior de envelopes de papel, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra-freezer a -70 °C.

3.4.5. Extração de RNA total

Utilizou-se o método de Lambais & Mehdy (1993), modificado. Foram triturados 3 g de tecido por amostra em nitrogênio líquido até o ponto de ser obtido um pó fino, o qual foi transferido a tubos de plástico, com capacidade de 50 mL. As amostras foram mantidas a -80 °C até serem processadas.

Adicionou-se às amostras de tecido, 9 mL de fenol saturado com TLE (tris 0,2M; LiCl 0,1M; EDTA 5mM pH 8,3) e 9 mL de tampão “Grinding” (Tris 0,2M; LiCl 0,1M; EDTA 5mM; SDS 1% pH 8,3). A mistura foi homogeneizada por 1 min e em seguida centrifugada 12.000 g a 4 °C durante 15 min. Após, o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Foi adicionado então a este, o mesmo volume de fenol saturado com TLE, homogenizou-se bem a mistura, a qual foi centrifugada a 12.000 g a 4 °C durante 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Adicionou-se metade do volume com fenol saturado com TLE e metade do volume com clorofórmio ao sobrenadante, o qual foi homogenizado e centrifugado (nas mesmas condições citadas anteriormente). Após este procedimento, foi adicionado ao sobrenadante o mesmo volume de clorofórmio. Esta mistura foi homogenizada, centrifugada e o sobrenadante transferido para novo tubo. Em seguida, adicionou-se 1/10 volume de 3M acetato de sódio (pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto gelado. O tubo foi mantido a -20 °C durante 48 horas, com o objetivo de se obter uma melhor precipitação do RNA total.

Após este período, o tubo foi centrifugado a 12.000 g, 4°C por 2 h. Descartou-se o etanol e o precipitado foi lavado com etanol 80%. Após a secagem do precipitado, este foi ressuspenso em 500 µL de água tratada com DEPC estéril (0,6 mL de dietil-

pirocarbonato em 1 litro de água MilliQ) e transferido para tubos Eppendorf de capacidade para 1,5 mL. Adicionou-se 1 μL de DNase (1U/ μL) e a mistura foi incubada a 37 °C por um período de 1 h. Com o objetivo de se retirar DNA digerido, excesso de polissacarídeos e proteínas da amostra, o material foi tratado com fenol e clorofórmio novamente. Para a precipitação do RNA total foi adicionado 3M de acetato de sódio e etanol absoluto gelado, sendo o material mantido a -20 °C por 12 horas. Após esse período, o material foi centrifugado (8.000g) por 20 min, descartando-se o sobrenadante e o precipitado lavado com etanol 80%. A seguir, ressuspendeu-se o precipitado em 200 μL de água esterilizada tratada com DEPC.

Para se calcular a concentração de RNA utilizou-se a diluição de 1/300 (do material obtido no procedimento anterior) e a leitura da absorbância foi realizada através de espectrofotômetro (Modelo U-2000 - Hitachi) à 260 e 280 nm ($1\text{OD}_{260} = 40\text{g RNA/mL}$).

3.4.6. Integridade do RNA

Para se verificar a integridade do RNA, foi realizada uma eletroforese em gel na concentração de aproximadamente 20 μg do ácido nucléico, sendo separado e desnaturado em gel de agarose 1% contendo formaldeído (0,5 g agarose; 5 mL 10X MOPS; 2,55 mL formaldeído 37%; 43,5 mL água DEPC) (Bellato et al., 1997).

Precipitou-se 20 μg de RNA, o qual foi dissolvido em 9,3 μL de DEPC-água. A seguir, adicionou-se 20 μL de formamida, 6,7 μL de formaldeído 37% e 10 μL de 10X MOPS (41,88 g MOPS; 6,804 g acetato de sódio; 20 mL EDTA). A mistura foi incubada a 60 °C por 5 min e em seguida esfriada no gelo. Adicionou-se 10 μL de tampão de carregamento (20% ficoll; EDTA 20mM; 0,15% azul de bromofenol) contendo 1 μL de brometo de etídio, sendo então o total de 50 μL corridos no gel de eletroforese (60V durante 1 h) em tampão 10X MOPS (40 ml de tampão 10X MOPS; 310 mL água DEPC).

3.4.7. Análise da expressão da FAL através de Dot-Blot

Foi adicionado a 30 µg/µL de RNA de cada amostra, 35 µL de SSC (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3M pH 7,0) 20X e 20 µL de formaldeído 37% (Wahl et al., 1981). As amostras foram desnaturadas a 60 °C por 15 min e em seguida transferidas, sob vácuo, para membrana (Hybond+ Nylon) pré-equilibrada em SSC 20X. O RNA foi fixado a membrana a 65 °C por 30 minutos. A seguir, a membrana foi pré-hibridizada em solução contendo: sarcosil 0,1%, SDS (sódio-dodecil sulfato) 7%, formamida deionizada 50%, fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0), SSC 5X, reagente bloqueador 2% e 100 µg de DNA de esperma de salmão a 50 °C durante 1,5 hora (conforme Boehringer Mannheim Biochemicals). A sonda do DNA da FAL foi desnaturada a 96 °C por 10 min e resfriada em gelo. A hibridização foi realizada em solução de pré-hibridização (volume de 5 mL) contendo 50 ng da sonda desnaturada a 50 °C por 13 h. Após este período, a membrana foi lavada duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1%, a temperatura ambiente durante 5 min e duas vezes em SSC 0,1X, SDS 0,1%, a 68 °C durante 15 min.

Para a detecção dos “dots” hibridizados, a membrana foi lavada em 20 mL do tampão 1 (ácido maléico 0,1M, NaCl 0,15M pH 7,5) e Tween 20 (0,3%) durante 5 min a temperatura ambiente e, em seguida, bloqueadas em tampão 2 (tampão 1 com 1% reagente bloqueador) (20 mL) por 30 min. O anticorpo anti-DIG foi diluído em tampão 2 (1 µL/10 mL), incubando-se a membrana por 30 min. As lavagens, para retirada do anticorpo livre, foram feitas duas vezes em tampão 1 com Tween 20 (0,3%), por 15 min. Após, a membrana foi equilibrada por 2 min em tampão 3 (Tris-HCl 1M pH 9,5 e NaCl 0,3M) e incubadas por 5 min em tampão 3 contendo o substrato diluído CSPD (1:100 - TROPIX Inc.). Em seguida, a membrana foi envolvida com filme plástico, incubada a 37 °C por 10 min e exposta à filme de raio-X (AR X-OMAT, Kodak) por 12 horas. Após este período, o filme foi revelado, conforme instruções do fabricante.

3.5. Influência de *Saccharomyces cerevisiae* no metabolismo fenólico

3.5.1. Preparação do material

O material de sorgo constituiu-se de mesocótilos obtidos segundo item 3.1.1., plantas com 14 dias de idade e folhas de plantas com 30 dias de idade obtidas de acordo com o item 3.1.2.

Foram obtidas suspensões de células de *S. cerevisiae* crescida em meio de BDA, adicionando-se água destilada sobre o meio contendo a levedura. As concentrações das suspensões de células utilizadas foram ajustadas para 1×10^8 células/mL. As suspensões de células foram aspergidas sobre o tecido vegetal, com o auxílio de um aspersor manual. Em um tratamento, foi aspergida da mesma forma suspensão de conídios de *C. sublineolum*, obtida conforme o item 3.2. Em outro tratamento, foram aspergidas suspensões de células de *S. cerevisiae*, seguidas logo após da aspersão de suspensão de conídios de *C. sublineolum*. Imediatamente após a aspersão, foi realizada a primeira coleta de amostra (correspondendo a 0 hora). O material foi colocado em câmara úmida, à aproximadamente 28 °C, sob fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

Para o material representado por mesocótilos foram coletadas 3 amostras por tratamento, (cada amostra consistiu de três mesocótilos com 5 cm de comprimento). As coletas foram realizadas 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a aspersão, sendo as amostras pesadas, colocadas em papel alumínio e armazenadas em congelador a -15 °C. A amostra de plantas com 14 dias foi representada por toda a parte aérea das mesmas, sendo então coletadas 3 plantas por amostra. No caso das plantas com 30 dias de idade, as amostras coletadas foram representadas por folhas, sendo coletadas 3 amostras por tratamento (3 repetições). As coletas foram realizadas 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o tratamento e o armazenamento do material foi realizado como descrito acima. Finalmente como controle, o material vegetal utilizado foi aspergido com água destilada e a coleta das amostras foi procedida conforme descrito acima, variando de acordo com o objetivo do experimento.

3.5.2. Extração dos fenóis

As amostras de tecido foram trituradas com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com auxílio de pistilo até a obtenção de pó fino. Em seguida, adicionou-se 7,5 mL de metanol 80% acidificado (0,1% HCl; v/v) (Nicholson et al., 1987) e a mistura foi homogeneizada 20 s com o uso de vortex. Após a precipitação do material vegetal, retirou-se o sobrenadante. A evaporação do sobrenadante foi realizado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45 °C. O resíduo obtido foi suspenso em 2 mL de água destilada e posteriormente utilizado na dosagem dos fenóis. No caso dos tecidos representados por plantas inteiras e folhas, o material foi particionado contra hexana até que toda a clorofila fosse removida.

3.5.3. Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos

Aliquotas de 150 µl dos extratos aquosos obtidos conforme descrito em 3.4.2. foram acrescidas de 1,5 mL de carbonato de sódio 2%. Após 5 min, foi adicionado às amostras, sob agitação constante, 150 µl de solução de reagente Folin-Ciocalteu 2N diluído em água destilada (1:1; v/v) (Bray & Thorpe, 1954). Como referência, foi utilizado metanol acidificado em substituição aos extratos aquosos. A concentração de fenóis de cada amostra, expressa em termos de equivalentes mg de ácido clorogênico por grama de peso fresco, foi determinada utilizando-se curva padrão (Apêndice 1) de concentrações de ácido clorogênico em água destilada, variando de 0 a 300 µg/mL em função de sua absorbância a 750 nm (Lopez & Pascholati, 1992). Todas as leituras foram efetuadas 30 min após a adição do reagente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Integridade do DNA plasmidial da FAL

A verificação da presença e a integridade do inserto do gene FAL resultante do processo de transformação do plasmídeo, pode ser visualizada na Figura 1, observando-se a banda correspondente a 0.50 Kb. Esses resultados comprovaram a digestão do plasmídeo (vetor pUC 19, correspondendo a 2.67 Kb) pelas enzimas *EcoRI* e *XbaI*.

4.2. PCR para obtenção da sonda

As reações de PCR foram realizadas com o objetivo de elaboração da sonda, através da amplificação da sequência dos genes da FAL e inserção de nucleotídeos marcados (digoxigenina). Na Figura 2, pode-se observar a banda que corresponde ao DNA amplificado (0.50 Kb), confirmando assim a sua presença e integridade.

4.3. Extração de RNA total

Após a quantificação do RNA total extraído de tecidos de sorgo (Tabela 1), foi verificada a integridade do mesmo através de eletroforese em gel de agarose formaldeído. As bandas referentes aos RNAs 28S e 18S foram visualizadas através de fluorescência em luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídeo (Figuras 3 e 4).

Estes resultados reforçam a confiabilidade de que todas as amostras colocadas na membrana de náilon para a hibridização, continham as alíquotas adequadas de RNA, de acordo com o protocolo empregado.

Figura 1 - Gel de eletroforese (1 = padrão DNA λ cortado com *Hind* III; 2 = plasmídeo digerido) indicando duas bandas na coluna 2, sendo que a 0,50 Kb corresponde ao inserto da FAL e a 2,67 Kb corresponde ao vetor pUC 19.

Figura 2 - Produto da amplificação do gene fenilalanina amônia-liase. Coluna 1 refere-se padrão DNA λ cortado com *Hind* III e coluna 2 ao DNA da FAL amplificado (0.50 Kb).

Tabela 1 - Quantidade de RNA total extraído de tecidos de sorgo

CULTIVAR	MATERIAL	TRATAMENTO	µg/µL de RNA
Brandes	mesocótilo	Água	1,81
Brandes	mesocótilo	<i>S. cerevisiae</i>	2,83
Brandes	mesocótilo	<i>C. sublineolum</i>	3,27
Brandes	mesocótilo	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i> *	2,12
Tx398B	mesocótilo	Água	2,52
Tx398B	mesocótilo	<i>S. cerevisiae</i>	2,55
Tx398B	mesocótilo	<i>C. sublineolum</i>	2,71
Tx398B	mesocótilo	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i>	1,65
Brandes	planta 14 dias	Água	1,26
Brandes	planta 14 dias	<i>S. cerevisiae</i>	2,96
Brandes	planta 14 dias	<i>C. sublineolum</i>	1,48
Brandes	planta 14 dias	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i>	1,87
Tx398B	planta 14 dias	Água	2,64
Tx398B	planta 14 dias	<i>S. cerevisiae</i>	5,23
Tx398B	planta 14 dias	<i>C. sublineolum</i>	3,39
Tx398B	planta 14 dias	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i>	3,75
Brandes	folha 30 dias	Água	2,86
Brandes	folha 30 dias	<i>S. cerevisiae</i>	2,31
Brandes	folha 30 dias	<i>C. sublineolum</i>	4,8
Brandes	folha 30 dias	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i>	3,0
Tx398B	folha 30 dias	Água	2,4
Tx398B	folha 30 dias	<i>S. cerevisiae</i>	3,0
Tx398B	folha 30 dias	<i>C. sublineolum</i>	1,6
Tx398B	folha 30 dias	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i>	2,0

* *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*; *C.s.* = *Colletotrichum sublineolum*

Figura 3 - Integridade do RNA total (20 μ g) extraído de tecidos de sorgo: Mesocótilos cv. Brandes: 1) testemunha; 2) *S. cerevisiae*; 3) *C. sublineolum*; 4) *S.c.+C.s.*; cv. Tx398B: 5) testemunha; 6) *S. cerevisiae*; 7) *C. sublineolum*; 8) *S.c.+C.s.*; Plantas 14 dias cv. Brandes: 9) testemunha; 10) *S. cerevisiae*; 11) *C. sublineolum*; 12) *S.c.+C.s.* 28S e 18S indicam subunidades do RNA.

Figura 4 - Integridade do RNA total (20 μ g) extraído de tecidos de sorgo: Planta 14 dias cv. Tx398B: 13) testemunha; 14) *S. cerevisiae*; 15) *C. sublineolum*; 16) *S.c.+C.s.*; Folha 30 dias cv. Brandes: 17) testemunha; 18) *S. cerevisiae*; 19) *C. sublineolum*; 20) *S.c.+C.s.*; cv. Tx398B: 21) testemunha; 22) *S. cerevisiae*; 23) *C. sublineolum*; 24) *S.c.+C.s.* 28S e 18S indicam subunidades do RNA.

4.4. Análise da expressão gênica da FAL

A Figura 5 exibe a foto da chapa de raio-X obtida conforme o item 3.4.7. Os “dots” que podem ser visualizados indicam a ocorrência da hibridização e assim, confirmam que nessas amostras, ocorreu a expressão dos genes da enzima FAL. Por sua vez, a Tabela 2 representa as reações diferenciais da Figura 5 através da simbologia positivo e negativo. Achou-se conveniente ilustrar o resultado por meio desta tabela, pois a foto obtida não retrata fielmente os detalhes da chapa de raio-X.

A escolha do período de retirada das amostras de todos os tecidos de sorgo (36 h) foi realizada com base nos trabalhos de Cui et al. (1996) e Weiergang et al. (1996), que verificaram a presença da expressão dos genes da FAL em tratamento controle, em tecidos representados por mesocótilos e plântulas. Pode-se verificar que nos tecidos representados pelos mesocótilos, todas as amostras hibridizaram, inclusive nos tecidos do tratamento controle (água), indicando assim a presença de níveis basais desta enzima neste período de amostragem (Weiergang et al., 1996). Nos tecidos representados pelas plantas de 14 dias e folhas de 30 dias, não ocorreu hibridização nos tratamentos controle, o que pode ser explicado pelo fato de que os níveis basais desta enzima diminuírem de acordo com a maturidade do tecido vegetal (Kervinen et al., 1997; Kombrink et al., 1993). Porém nos tratamentos com a presença do agente patogênico *C. sublineolum*, pode-se observar a expressão gênica em plantas com 14 dias de ambos os cultivares, demonstrando que houve um reconhecimento pela planta, a qual respondeu com a produção da FAL. De acordo com Ferreira & Warren (1982) e Nicholson et al. (1987; 1988), plantas de sorgo só apresentam características de suscetibilidade após 30 dias de idade, supõe-se portanto, que aos 14 dias as duas variedades empregadas poderiam estar resistentes e apresentando então, a mesma reação metabólica. Pode-se observar a presença de um “dot” muito fraco no tratamento com *S. cerevisiae* nas plantas do cultivar Brandes, sendo que o mesmo não é observado no cultivar Tx398B. Neste caso, não é recomendável afirmar que a levedura esteja induzindo a expressão dos genes, visto que o material utilizado continha, além de folhas, tecido oriundo do caule, nos quais poderiam estar ainda presentes níveis basais da FAL. No tecido vegetal representado por folhas

com 30 dias, observa-se a presença de “dots” de intensidade fraca nos tratamentos com a presença de *C. sublineolum* e somente nas folhas da variedade Brandes. Considerando-se o fato que a partir desta idade, os cultivares já apresentam resposta diferencial em relação a resistência e suscetibilidade, pode-se concluir que somente o cultivar resistente está respondendo ao tratamento com a expressão dos genes da enzima. Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que a levedura *S. cerevisiae* não induziu a expressão dos genes da FAL, o que ocorre somente após tratamento com o agente patogênico.

Figura 5 - Resultado da hibridização do RNA total extraídos de tecidos de sorgo com a sonda do DNA da FAL. *S.c.* = *S. cerevisiae*; *C.s.* = *C. sublineolum*; *S.c. + C.s.* = *S. cerevisiae* + *C. sublineolum*.

Tabela 2 - Reações diferenciais da hibridização DNA:RNA, com base na Figura 5.

Tecido	Água	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. sublineolum</i>	<i>S.c.</i> + <i>C.s.</i> *
Mesocótilo				
Brandes	+++	+	+	+
Tx398B	+	+	+	+
Planta (14 dias)				
Brandes	-	+	+	+
Tx398B	-	-	+	+
Folha (30 dias)				
Brandes	-	-	+	+
Tx398B	-	-	-	-

* *S.c.* = *S. cerevisiae*; *C.s.* = *C. sublineolum*

** + = presença reação; - = ausência reação

4.5. Acúmulo de compostos fenólicos totais

De acordo com os resultados obtidos com tecidos de mesocótilos, pode-se observar que ocorreu um acúmulo de fenóis em todos os tratamentos, no decorrer do tempo, em ambos os cultivares (Figuras 6 e 7). Supõe-se que estes resultados possam estar relacionados com os obtidos na expressão gênica da enzima FAL, pois no período de 36 horas todos os tecidos dos diferentes tratamentos apresentaram a expressão. Como esta enzima está relacionada com a biossíntese dos compostos fenólicos, era de se esperar que nas horas seguintes houvesse uma maior produção destes em relação ao período correspondente ao início do experimento. Nos tratamentos onde o agente patogênico esteve presente, 48 horas após já era evidente uma diferença significativa nos valores obtidos na quantidade de fenóis em relação aos tratamentos testemunha e *S. cerevisiae*, (foi realizado teste estatístico de Duncan $P = 5\%$ para estes pontos) indicando que o tecido vegetal apresentara resposta ao *C. sublineolum*. O fato dos dois cultivares terem apresentado a mesma resposta na presença do patógeno, provavelmente se deva por ambas ainda apresentarem a característica de resistência (Ferreira & Warren 1982; Nicholson et al. 1987; 1988). Este parâmetro pôde ser avaliado neste tipo de tecido com sucesso, pois os mesocótilos apresentam uma constituição química e fisiológica bem mais simples que tecidos mais velhos, não apresentando qualquer tipo de pigmento, como a clorofila.

Os resultados obtidos com material representado por plantas com 14 dias e folhas com 30 dias não foram satisfatórios, pois os mesmos mostraram-se bastante divergentes e sem possível explicação racional (Figuras 8, 9, 10 e 11). Os experimentos poderiam ser melhorados pelo uso de metodologias e recursos mais sofisticados como por exemplo, a cromatografia de alta pressão (HPLC), que permitiria a detecção e a separação de compostos fenólicos específicos.

Figura 6 - Acúmulo de compostos fenólicos em mesocótilos de sorgo (cv. Brandes) tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições.

Figura 7 - Acúmulo de compostos fenólicos em mesocótilos de sorgo (cv. Tx398B) tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições.

Figura 8 - Acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo com 14 dias de idade (cv. Brandes), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições.

Figura 9 - Acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo com 14 dias de idade (cv. Tx398B), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições.

Figura 10 - Acúmulo de compostos fenólicos em folhas de sorgo com 30 dias de idade (cv. Brandes), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições.

Figura 11 - Acúmulo de compostos fenólicos em folhas de sorgo com 30 dias de idade (cv. Tx398B), tratados com água, *S. cerevisiae* ou *C. sublineolum*. Barras indicam $\pm$ erro padrão da média de 3 repetições.

5. CONCLUSÕES

- O agente patogênico *Colletotrichum sublineolum* induz a expressão gênica da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) em tecidos de sorgo representados por plantas com 14 dias de idade dos cultivares Brandes e Tx398B e folhas com 30 dias do cultivar Brandes.

- *C. sublineolum* induz o acúmulo de compostos fenólicos totais no decorrer do tempo, nos tecidos de sorgo representado por mesocótilos dos dois cultivares empregados.

- Os tecidos vegetais de sorgo não apresentaram resposta aos parâmetros avaliados em relação ao tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, a proteção de plantas por este agente pode envolver outros passos do metabolismo fenólico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. IN: BAYLEY, J.A. ; DEVERAL, B.J. (Ed.) **The Dynamics of Host Defense**. Sydney: Academic. Press, 1983. p.33-70.

AMORIN, L. Infecção. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1995. cap.15, p.295-308.

BAKER, R. Diversity in biological control. **Crop Protection**, v.10, p.85-94, 1994.

BELLATO, C.; KRISHNAN, H.B.; CUBO, T.; TEMPRANO, F.; PUEPPKE, S.G. The soybean cultivar specificity gene *nolX* is present, expressed in a *nodD* - dependent manner, and a symbiotic significance in cultivar - nonspecific strains of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *fredii*. **Microbiology**, v.143, p.1381-1388, 1997.

BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.21-81, 1981.

BETTIOL, W. (Org.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPDA, 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documento, 15), 1991a.

BIEHN, W.L.; KUC, J.; WILLIAMS, E.B. Accumulation of phenols in resistant plant-fungi interactions. **Phytopathology**, v.58, p.1255-1260, 1968.

BRAY, H.G.; THORPE, W.V. Analysis of phenols compounds of interest in metabolism. **Methods of Biochemical Analysis**, v.1, p.27-52, 1954.

CAMM, E.L.; TOWERS, G.H.N. Phenylalanine ammonia-lyase. **Progress in Phytochemistry**, v.4, p.169-188, 1977.

CAMPBELL, R. Biological control of soil borne diseases: some present problems and different approaches. **Crop Protection**, v.13, n.1, p.4-13, 1994.

CARDWELL, K.F. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. **Plant Disease**, v.73, n.3, p.255-257, 1989.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. Proposta de um sistema de classificação de raças de *Colletotrichum graminicola*, agente causal de antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*). **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.4, p.337-344, 1987.

CHAUDHARY, K.C.B.; MATHUR, S.B. Infection of sorghum seeds by *Colletotrichum graminicola*. 1. Survey, location in seed and transmission of the pathogen. **Seed Science & Technology**, v.7, p.87-92, 1979.

CHET, I. *Trichoderma* - application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil-borne plant pathogenic fungi. IN: CHET, I (Ed.) **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York, John Wiley and Sons, p.137-160, 1987.

CHET, I.; ORDENLICH, A.; SHAPIRA, R.; OPPENHEIM, A. Mechanims of biocontrol of soil borne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant Soil**, v.129, p.85-92, 1990.

- CHYLINSKA, K.M.; KNYPL, J.S. Decreased phenylalanine ammonia-lyase and ribonuclease activity in side roots of carrot infested with the northern root-knot nematode. **Nematologica**, v.21, p.129-133, 1975.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul. The American Phytopathological Society, 1983. 213p.
- CUI, J.; MAGILL, J.; FREDERIKSEN, R.; MAGILL, C. Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, n.3, p.187-199, 1996.
- DA SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal Plant Disease Protection**, v.99, p.159-167, 1992.
- DUKE, S.O.; NAYLOR, A.W. Effects of light on phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown *Zea mays* (L.) seedlings. **Plant Science Letters**, v.6, p.361-367, 1976.
- DUKE, N.; RAMIREZ, A.V.; TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. **Journal of Phytopathology**, v.119, p.232-239, 1987.
- EDWARDS, K.; CRAMER, C.L.; BOLWELL, G.P.; DIXON, R.A.; SCHUCH, W.; LAMB, C.J. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. **Proceedings National Academy of Science USA**, v.82, p.6731-6735, 1985.

- EGGER, K. Plant phenol derivatives. In: STANL, E. (Ed.) **A laboratory handbook**. 2^aed. Springer-Verbeg, New York, VII(4), p.687-706, 1969.
- F.A.O. (Food and Agricultural Organization of the United Nations). **Quarterly Bulletin Statistic**.v.3, p.36, 1990.
- FERNANDES, F.T.; SCHAFFERT, R.E. Antracnose of sorghum in Brazil. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SORGHUM DISEASE. Hyderabad, India. **Proceedings Andhra Pradesh, ICRISAT**. P.295-296, 1978.
- FERNANDES, N.G. Método de avaliação e herança da resistência a *Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal) C.G. Shaw em sorgo (*Sorghum bicolor*) (L.) Moench). Jaboticabal, 1981. Monografia (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- FERREIRA, A.; WARREN, H.L. Resistance of sorghum to *Colletotrichum graminicola*. **Plant Disease**, v.66, n.9, p.773-775, 1982.
- FREDERIKSEN, R.A. Compendium of Sorghum Disease, 2nd edition, Saint Paul, The American Phytopathological Society, 1991, 82p.
- FREITAS, J.C.; ZARAMELA, G.S.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de agentes bióticos e abióticos no acúmulo de um complexo de pigmentos e fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.349, 1993 (Resumo).
- FRIEND, J.; REYNOLD, S.B.; AVEYARD, M.A. Phenolic metabolism in potato tuber tissue after infection with *Phytophthora infestans*. **Biochemical Journal**, v.124, p.29-35, 1971

- FRITZEMEIER, K.H.; CRETIN, C.; KOMBRINK, E.; ROHWER, F.; TAYLOR, J.; SCHEEL, D.; HAHLBROCK, K. Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNAs in potato leaves infected with virulent and avirulent races of *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v.85, p.34-41, 1987.
- GEBALLE, G.T.; GALSTON, A.W. Wound-induced lignin formation and resistance to cellulase in oat leaves. **Phytopathology**, v.73, p.613-623, 1983.
- GREEN, N.E.; HADWIGER, L.A.; GRAHAM, S.O. Phenylalanine ammonia-lyase, tryrosine ammonia-lyase and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. **Phytopathology**, v.65, p.1071-1074, 1975.
- HADWIGER, L.A.; HESS, S.L.; BROEMBSSEN, J. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase activity and phytoalexin production. **Phytopathology**, v.60, p.332-336, 1970.
- HADWIGER, L.A.; OGAWA, T.; KUYAMA, H. Chitosan polymer size effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.7, n.4, p.531-533, 1994.
- HARBORNE, J.B. General procedures and measurement of total phenolics. In: DEY, P.M. & HARBORNE, J.B.(Ed.) **Methods in Plant Biochemistry**. San Diego, Academic Press. v.1, p.23-41, 1989.
- HEIM, D.; NICHOLSON, R.L.; PASCHOLATI, S.F.; HAGERMAN, A.E.; BILLET, W. Etiolated maize mesocotyls: a tool for investigating disease interactions. **Phytopathology**, v.73, p.424-428, 1983.

- I.B.G.E. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Agropecuária, extração vegetal e pesca. **Anuário Estatístico do Brasil**. 88/89, Rio de Janeiro, cap.25, p.341-342, 1989.
- KERVINEN, T.; PELTONEN, S.; UTRIAINEN, M.; KANGASJÄRVI, J.; TEERI, T.H.; KARJALAINEN, R. Cloning and characterization of cDNA clones encoding phenylalanine ammonia-lyase in barley. **Plant Science**, v.123, p.143-150, 1997.
- KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas e a importância do monitoramento. **Agricultura Ciba-Geigy**, v.1, p.5-7, 1987.
- KOMBRINK, E.; BEERHUES, L.; GARCIA-GARCIA, F.; HAHLBROCK, K.; MÜLLER, M.; SCHRÖDER, M.; WITTE, B.; SCHMELZER, E. Expression patterns of defense-related genes in infected and uninfected plants. In: FRITIG, B.; LEGRAND, M. (Ed.) **Mechanisms of Plant Defense Responses**. Netherlands, Kluwe Academic Publishers. 1993, p.236-249.
- KUC, J.; RUSH, C. Phytoalexins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.26, n.2. p.455-472, 1985.
- KUHN, D.N.; CHAPPELL, J.; BOUDET, J.; HAHLBROCK, K. Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase in cultured plant cells by UV light and fungal elicitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.81, p.1102-1106, 1984.
- LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, n.1, p.75-83, 1993.

- LAMBAIS, M.R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. São Paulo; Editora Agronômica Ceres Ltda., 1995. cap. 26, p.507-538.
- LASCA, C.C.; VECCHIATO, M.H.; VALARINI, P.J. Detecção e identificação de fungos em sementes de sorgo (*Sorghum* sp.) produzidas no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v.53, n.1/4, p.47-54, 1986.
- LAWTON, M.A.; LAMB, C.J. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. **Molecular Cell Biology**, v.7, p.335-341, 1987.
- LEITE, B. Production of mycosporine-alanine, acetic acid and uridine by cultures of *Colletotrichum graminicola*: their role in conidial maturation and development. Purdue, 1992. 89p. Thesis (Ph.D.) - University of Purdue.
- LEITE, B; PASCHOLATI, S.F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1995. cap. 21, p.393-416.
- LEONARD, K.J.; THOMPSON, D.L. Effects of temperature and host maturity on lesion development of *Colletotrichum graminicola* on corn. **Phytopathology**, v.66, p.635-639, 1976.
- LIPPS, P.E. Survival of *Colletotrichum graminicola* in infected corn residues in Ohio. **Plant Disease**, v.67, p.102-104, 1983.

- LO, S-C; NICHOLSON, R.L. Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls. **Plant Physiology**, v.116, p.979-989, 1998.
- LOPEZ, A.M.Q.; PASCHOLATI, S.F. Caracterização preliminar de preparações de *Saccharomyces cerevisiae* que protegem plantas de sorgo contra antracnose. **Summa Phytopathologica**, v.17, p.19, 1991. (Resumo).
- LOPEZ, A.M.Q. Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. em sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench). Rio Claro, 1991. 203p. Dissertação (M.S.) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
- LOPEZ, A.M.Q.; PASCHOLATI, S.F. Accumulation of a complex of pigments in sorghum mesocotyls in response to wounding. **Journal of Phytopathology**, v.135, p.62-70, 1992.
- LOSCHKE, D.C.; HADWIGER, L.A; SCHRÖDER, J.; HAHLBROCK, K. Effects of light and of *Fusarium solani* on synthesis and activity of phenylalanine ammonia-lyase in peas. **Plant Physiology**, v.68, p.680-685, 1981.
- LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças das plantas. In: LUZ, W.C. (Ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1993, p.33-77.
- MADAMANCHI, N.R.; KUC, J. Induced systemic resistance in plants. In: COLE, G.T. & HOCH, H.C. (Ed.) **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York, Plenum Press. p.347-362, 1991.

- MALCA, I.; ULLSTRUP, A.J. Effects of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium turcicum*. **Bulletin of Forrey Botanical**, v.89, p.149-159, 1962.
- MANSFIELD, J.W. Antimicrobial compounds. In: CALLOW, J.A (Ed.) **Biochemical Plant Pathology**. Chichester, John Wile & Sons, 1983, p.237-265.
- MARTIN, J.; GROSSMAN, F. Inhibition os pectic and cellulolytic enzymes of *Rhizoctonia solani* Kuhn and the influence of some inhibitors on the disease process. **Phytopathologische Zeitzchrift**, v.76, p.38, 1972.
- MARTINELLI, J.A Aspects of induced resistance of barley (*Hordeum vulgare*) to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). **Summa Phytopathologica**, v.18, p.207-219, 1992.
- MARTINS, E.M.F.; DE MAIA, A.C.; GRUNEWALDT-STOCKER, G.; MORAES, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffe leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.899-909, 1986.
- MARTINS, E.M.F. Controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991, cap. 21, p.345-363.
- MORAES, W.B.C. Controle alternativo aplicado a cultura do café. IN: III REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, PIRACICABA/SP. **Anais da III Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas**, Piracicaba, 1989, p.36-44.

- MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CONTROLE BIOLÓGICO. BRASÍLIA/DF. **Anais do II Simpósio Internacional de Controle Biológico**. Brasília, CENARGEM, 1990, p.60-61.
- MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991, cap.10, p.157-179.
- MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. 1ª ed., Brasília, EMBRAPA, cap. 10, p.157-179, 1991.
- NARAYANASWAMY, P. Phenylalanine ammonia-lyase and tryrosine ammonia-lyase in *Alternaria alternata* infected groundnut leaves. **Indian Phytopathology**, v.33, p.507-508, 1980.
- NICHOLSON, R.L.; WARREN, H.L. Criteria for evaluation of resistance to maize anthracnose. **Phytopathology**, v.66, p.86-90, 1976.
- NICHOLSON, R.L.; MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v.70, n.3, p.255-261, 1980.
- NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C.; CADENA-GOMEZ, G. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.84, n.16, p.5520-5524, 1987.

- NICHOLSON, R.L.; JAMIL, F.F.; SNYDER, B.A.; LUE, W.L.; HIPSKIND J. Phytoalexin synthesis un the juvenile sorghum leaf. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.33, p.271-278, 1988.
- NICHOLSON, R.L. *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose disease of maize and sorghum. In: BAILEY, J.A; JEGER, M.L. (Ed.) **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford, CAB International, 1992. p.186-202.
- NICHOLSON, R.L.;HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.30, p.369-389, 1992.
- ORCZYK, W., HIPSKIND, J.; NEERGAARD, E.D.; GOLDSBROUGH, P.; NICHOLSON, R.L. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase in sorghum in response to inoculation with *Bipolaris maydis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.48, p.55-64, 1996.
- ORR, J.D.; EDWARDS, R.; DIXON, R.A. Stress responses in alfafa (*Medicago sativa* L.). XIV. Changes in the level of phenylpropanoid pathway intermediates in relation to regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase in elicitor-treated cell-suspension cultures. **Plant Physiology**, v.101, p.847-856, 1993.
- PANIZZI, R.C.; FERNANDES, N.G. Doenças do sorgo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.) **Manual de fitopatologia. doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., 1997. p.676-689.

- PASCHOLATI, S.F.; HEIM, D.; NICHOLSON, R.L. Phenylalanine ammonia-lyase and susceptibility of maize mesocotyl to *Helminthosporium maydis*. **Physiological Plant Pathology**, v.27, p.345-356, 1985.
- PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, AR. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculation with *Helminthosporium carbonum* or heat inactivated. *M. melonis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, n.3, p.507-514, 1986.
- PASCHOLATI, S.F.; NICHOLSON, R.L.; BUTLER, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v.115, p.165-172, 1986.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, AM.; PICININI, E.C. (Ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1994, Vol.2. p.1-51.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. 1995., cap. 22, p.417-453.
- PASCHOLATI, S.F. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Piracicaba, 1998. 123p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- PEDERSEN, W.L.; PERKINS, J.M.; RADTKE, J.A.; MILLER, R.J. Field evaluation of corn inbreds and selections for resistance to *Exserohilum turcicum* race 2. **Plant Disease**, v.70, p.376-377, 1986.
- PELLEGRINI, L.; ROHFRITSCH, O.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. **Plant Physiology**, 106:877-886, 1994.
- PELTONEN, S.; KARJALAINEN, R. Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley after infection with *Bipolaris sorokiniana* or treatment with its purified xylanase. **Journal of Phytopathology**, v.143, p.239-245, 1995.
- PICCININ, E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá azedo amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalipto (*Eucaliptus* spp.) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Piracicaba, 1995. 107p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- PRASAD, K.V.V.; KHARE, M.N.; JAIN, A.C. Site of infection and further development of *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson in naturally infected sorghum grains. **Seed Science & Technology**, v.13, p.37-40, 1985.
- PUROSHOTHAMAN, D. Phenylalanine ammonia-lyase and aromatic aminoacids in rice varieties infected with *Xanthomonas oryzae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.80, p.171-175, 1974.

RAHE, J.E.; KUC, J.; CHUANG, C.M. WILLIAMS, E.S. Correlation of phenolic metabolism with histological changes in *Phaseolus vulgaris* inoculated with fungi. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v.75, p.58-71, 1969.

REGLINSKI, T; LYON, G.D.; NEWTON, AC. Induction of resistance mechanisms in barley by yeast derived elicitors. **Annual Applied of Biology**. v.124, p.509-517, 1994.

RIBÉREAU-GAYON, P. Plant Phenolics. In: RIBÉREAU-GAYON,P (Ed.) Edinburgh. T. & A. Constable Ltda. 1972. p.188-194.

RONCATTO, MC.; PASCHOLATI, S.F. Mesocótilos estiolados de sorgo: bioensaio para a caracterização de frações de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas na proteção de plantas de sorgo contra fungos. In: **6ª REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO**, São Paulo, 1993, p.31 (Resumo).

ROVERATTI, D. Proteção de café (*Coffea arabica* L.) contra *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. por *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Piracicaba, 1989. 94p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SALUNKHE, D.K.; SHARMA, R.P. Introduction to phytoalexins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. (Ed.) **Mycotoxins and Phytoalexins**. Boca Raton - CRD Press, Cap. 19, 1991.

SANHUEZA, R.M.V. Controle biológico de fitopatógenos em casa de vegetação. IN: **IV REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS**

DE PLANTAS, PIRACICABA, SP. **Anais da IV Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas**, Campinas, 1991, p.107-114.

SÃO PAULO, SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Mercado de produtos: milho**. Prognóstico Agrícola 88/89. v.1. p56-63, 1988.

SEQUEIRA, L. Mechanisms of induced resistance in plants. **Annual Review of Microbiology**, v.37, p.51-79, 1983.

SHERIFF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, v.99:475-478, 1995.

SIDDIQUI, M.R.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, P. Longevity in pathogenicity of *Colletotrichum* spp. in seed stored at 5 °C. **Seed Science & Tecnology**, v.11, p.353-361, 1983.

STANGARLIN, J.R.; LOPEZ, A.M.Q.; PASCHOLATI, S.F. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e *Metarhizium anisopliae* no controle da helmintosporiose em milho pipoca (*Zea mays*) e da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*). IV Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, **Anais**, EMBRAPA, Campinas. pág.23, 1991.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.16-21, 1994.

STAUB, T.; SOZZI, D. Fungicide resistance: a continuing challenge. **Plant Disease**, v.68, p.1026-1031, 1984.

TENA, M.; VALBUENA, R.L. Increase in phenylalanine ammonia-lyase activity caused by *Plasmopora halstedii* in sunflower seedlings resistant and susceptible to downy mildew. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.107, p.47-56, 1983.

THAKUR, R.P.; LEONARD, K.J.; JONES, R.K. Characterization of a new race of *Exserohilum turcicum* virulent on corn with resistance genes *Htn*. **Plant Disease**, v.73, p.151-155, 1989.

VAN DRIESCHE, R.G.; BELLOWS JÚNIOR, T.S. **Biological Control**. New York: Chapman & Hall, 1996. 539p.

VEGETTI, T.H.; CONTI, G.C.; PESCE, P. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase during the development of local necrotic lesions in pinto bean leaves infected with alfalfa mosaic virus. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.84, p.153-171, 1975.

WAHL, G.M.; ONG, E.; MEINKOTH, J.; FRANCO, R.; BARINAGA, M. **Methods for the transfer of DNA, RNA and proteins to nitrocellulose and diazotized paper solid supports**. Keene: Schleicher & Schuell, Inc., 1981. p.26-27.

WEIERGANG, J.; HIPSKIND, J.D.; NICHOLSON, R.L. Synthesis of deoxyanthocyanidin phytoalexins in sorghum occurs independent of light. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.49, p.377-388, 1996.

WHITE, G.B. Economics of plant disease control. In: Konmeddahl, T. & Willians, P.H., (Ed.) **Challenging problems in plant health.** St. Paul. The American Phytopathological Society, 1983. p.477-486.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Curva padrão para compostos fenólicos totais, expressos em µg de ácido clorogênico / mL.