CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIOS DE INFECÇÃO DE *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays* L.), COM BASE NOS MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

JOSÉ RENATO STANGARLIN

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1995

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

Stangarlin, José Renato

Caracterização de sítios de infecção de *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.), com base nos mecanismos de defesa vegetal / José Renato Stangarlin. - - Piracicaba, 1995.
93p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Helmintosporiose do milho 2. Milho-genótipo - Interação patógeno-hospedeiro
3. Milho - Linhagem - Resistência à doença I. Título

CDD 633.15
632.44

CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIOS DE INFECÇÃO DE *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays* L.), COM BASE NOS MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

JOSÉ RENATO STANGARLIN

Aprovada em: 26.01.1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais

ESALQ/USP

Prof. Dr. Breno Leite

UFPR-Curitiba

Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Orientador

Aos meus pais Antonio e Isabel,

irmãos Marisa, Antonio Ricardo, José Adriano e Ernesto,
sobrinhos Gabriel e Carolina,

que mesmo à distância me deram todo o amor, carinho,
compreensão e incentivo necessários para a conclusão
de mais uma etapa em minha carreira acadêmica,

dedico.

“Se eu tivesse o dom de profetizar e conhecesse tudo sobre o que vai acontecer no futuro, soubesse tudo sobre todas as coisas, e contudo não amasse os outros, que bem faria isso? ... Todos os dons e poderes especiais que vêm de Deus terminarão um dia, porém o amor continuará para sempre ... O amor é muito paciente e bondoso, nunca é invejoso ou ciumento, nunca é presunçoso nem orgulhoso, nunca é arrogante, nem egoísta, nem tampouco rude. O amor não exige que se faça o que ele quer. Não é irritadiço, nem melindroso. Não guarda rancor e dificilmente notará o mal que os outros lhe fazem. Nunca está satisfeito com a injustiça, mas se alegra quando a verdade triunfa. Se você amar alguém será leal para com ele, custe o que custar. Sempre acreditará nele, sempre esperará o melhor dele, e sempre se manterá em sua defesa.”

I CORÍNTIOS 13

AGRADECIMENTOS

No decorrer da vida nos deparamos com milhares de pessoas, mas por algum motivo desconhecido, acabamos por estabelecer uma afinidade muito grande com algumas apenas. O Prof. Sérgio F. Pascholati é sem dúvida uma dessas pessoas, na qual eu posso ver, não apenas o profissional extremamente competente que ele é, mas também o grande amigo com o qual muitas alegrias compartilhei. Muito obrigado Sérgio!

O Laboratório de Fisiologia do Parasitismo foi meu ambiente de trabalho durante muitas horas do dia e da noite, durante vários meses. O que permitiu suportar todas as aflições e vencer o cansaço foi a companhia dos amigos Kátia e Robson, Nelson e Cecília, Hélio e Fabiana, Márcia e Marilda, Everaldo e Thaís e Marise e João, que tornaram o ambiente e o convívio tão agradáveis.

Muitas foram as coisas sobre as quais eu adquiri conhecimentos durante esses anos de curso, tais como o efeito de agentes bióticos e abióticos na indução da tristeza, do desespero, da dor, do sofrimento, do desamparo. Mas a minha maior aquisição foi descobrir o efeito do agente Divino sobre nossas vidas, pois com Cristo em nossos corações podemos transformar a tristeza em alegria, o desespero em esperança, a dor em alívio, o sofrimento em conforto, o desamparo em companhia. À Kátia, o meu agradecimento especial por me ensinar a palavra d'Ele. Que Deus te abençoe!

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de estudos (Processo: 93/1691-1).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Epidemiologia comparativa: doenças de climas tropical e temperado	4
2.2. Caracterização de sítios de infecção	5
2.3. Mecanismos de defesa da planta	6
2.3.1. Compostos fenólicos	7
2.3.1.1. Relação entre compostos fenólicos e resposta de defesa das plantas em diferentes patossistemas	8
2.3.2. Proteínas relacionadas à patogênese	10
2.3.2.1. Classificação das proteínas RP	12
2.3.2.2. Indução da produção das proteínas RP	15
2.3.3. Enzimas associadas aos mecanismos de defesa das plantas	16
2.3.3.1. Peroxidase	17
2.3.3.1.1. Características das peroxidases	17
2.3.3.1.2. Relação entre peroxidases, fenóis e ligninas	18
2.3.3.2. Fenilalanina amônia-liase	20
2.3.3.2.1. Características da enzima	20
2.3.3.2.2. FAL e a biossíntese de compostos fenólicos	21
2.4. Quantificação de fungos em tecidos vegetais através do ergosterol	22

3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Material vegetal	24
3.2. Obtenção, manutenção e inoculação de <i>E. turcicum</i>	25
3.3. Ensaio de cinética de crescimento das lesões	26
3.4. Curva de desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais	26
3.5. Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos	27
3.6. Determinação das atividades de quitinases e β -1,3 glucanases	28
3.7. Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase	29
3.8. Determinação da atividade de peroxidases	30
3.9. Caracterização isoenzimática das peroxidases	31
3.10. Determinação do conteúdo total de proteínas	32
3.11. Quantificação de ergosterol nos tecidos inoculados	32
3.12. Testes histoquímicos para a presença de lignina	33
3.13. Microscopia eletrônica de varredura	34
3.14. Bioensaio para frações fungitóxicas presentes nos extratos dos tecidos inoculados	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais	36
4.2. Cinética de crescimento das lesões	37
4.3. Compostos fenólicos, atividade de fenilalanina amônia-liase e frações fungitóxicas	40
4.4. Atividade de peroxidases.....	42
4.5. Atividade de quitinases e β -1,3 glucanases	44
4.6. Relação entre os resultados obtidos e o conceito de lesão virtual ...	46
5. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
APÊNDICE	69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Representação esquemática da microcâmara-de-inoculação (adaptado de BERGSTROM & NICHOLSON, 1983) 70
- Figura 2 Regiões da folha de milho amostradas 12 dias após a inoculação com *E. turcicum* (1×10^4 esporos/ml). **LE**: lesão necrótica; **HA**: tecido verde com 2,0 mm de largura adjacente à lesão necrótica; **TV**: tecido verde distante da lesão necrótica e/ou pontos cloróticos; **PC**: pontos cloróticos; **SA**: tecido sadio de folha não inoculada. Na linhagem resistente ao patógeno foram coletadas somente as amostras SA, TV e PC, enquanto que na suscetível os cinco tipos de regiões foram amostradas .. 71
- Figura 3 Germinação (A), formação de apressórios (B) e penetração (C) de conídios de *E. turcicum*, inoculado na concentração de 1×10^4 esporos/ml, em folhas de milho de linhagens resistente (■) e suscetível (□). As barras representam o erro padrão da média 72
- Figura 4 Cinética de crescimento de lesões causadas por *E. turcicum* (1×10^4 esporos/ml) em folhas de milho de linhagens suscetível (A) e resistente (C). Em (B) e (D) estão representados o nº de lesões (LE; ■) e/ou pontos cloróticos (PC; □) formados/folha 14 dias após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média 73

- Figura 5 Sintomas resultantes da inoculação com *E. turcicum* (1×10^4 esporos/ml) em linhagens de milho suscetível (A) e resistente (B), através de microcâmara-de-inoculação. LN: lesão necrótica; PC: pontos cloróticos; LI: local de inoculação; Barra = 1 cm 74
- Figura 6 Cortes transversais de folhas de milho suscetível à *E. turcicum*, mostrando a presença de micélio (M) no interior dos vasos do xilema (VX), 12 dias após a inoculação. Fotografias obtidas em microscópio ótico. (A): material colorido com azul de o-toluidina; (B): material sem coloração. Barra = 25 μm 75
- Figura 7 Cortes transversais de folhas de milho coletadas 12 dias após a inoculação com *E. turcicum*, mostrando a presença de micélio (M) no interior dos vasos do xilema (VX). (A) e (B): linhagem suscetível (1050 X e 2600 X, respectivamente); (C): linhagem resistente (3300 X); (D): linhagem suscetível não inoculada (775 X). Micrografia eletrônica de varredura 76
- Figura 8 Curva padrão para o ácido clorogênico (0 a 300 $\mu\text{g/ml}$)..... 77
- Figura 9 Conteúdo de compostos fenólicos em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média 78
- Figura 10 Curva padrão para a determinação da concentração de ácido *trans*-cinâmico 79

- Figura 11 Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média 80
- Figura 12 Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando reagente concentrado 81
- Figura 13 Bioensaio para a caracterização de frações fungitóxicas presentes em folhas de linhagens de milho suscetível e resistente inoculadas com *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml. A área clara ao redor das bandas indica inibição do crescimento fúngico. (A): Cromatografia de camada delgada ("TLC"); (B): Características das frações obtidas por "TLC" 82
- Figura 14 Atividade de peroxidase em folhas de milho de linhagens suscetível (A) e resistente (B) à *E. turcicum*. Amostras coletadas a diferentes intervalos de tempo após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml. Em (C) está representada a atividade enzimática nos tecidos inoculados em relação aos tecidos sadios não inoculados. Barras representam o erro padrão da média 83

- Figura 15 Folhas de milho resistente inoculadas com 1×10^4 esporos/ml de *E. turcicum*, exibindo regiões de lignificação. (A): pontos de penetração do patógeno (PP); (B): detalhe de um ponto de penetração mostrando conídio (C) e apressório (A). (C): micélio (M) nos tecidos da planta. Amostras coletadas 24 e 48 h após a inoculação em (A) e (C), respectivamente. Lignificação representada pela coloração azul. Fotografia obtida em microscópio ótico. Barra = 25 μ m 84
- Figura 16 Atividade de peroxidase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média 85
- Figura 17 (A): Eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extrato de folhas de milho suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. IG: interseção entre os géis concentrador e de corrida. SA, TV, HA, LE e PC regiões amostradas representadas na Figura 2; M: extrato do micélio do patógeno. (B): Padrão eletroforético representado por densitometria (filtro de 405 nm), onde os números representam as bandas individuais (a: Linhagem resistente; b: linhagem suscetível) 86
- Figura 18 Curva padrão para determinação de glicose através do método de Lever 87

- Figura 19 Atividade de β -1,3 glucanase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média 88
- Figura 20 Influência da concentração do extrato enzimático na determinação da atividade de quitinase *in vitro*. A curva representa a absorbância a 550 nm de solução contendo 200 μ l de "CM-Chitin-RBV" e 800 μ l de tampão acetato 89
- Figura 21 Atividade de quitinase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média 90
- Figura 22 Curva padrão mostrando a relação entre o peso seco do micélio de *E. turcicum*, cultivado em meio LCH, e a quantidade de ergosterol presente 91
- Figura 23 Quantidade de micélio de *E. turcicum* presente em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente ao patógeno. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sumário dos dados referentes ao acúmulo de compostos fenólicos, atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidases, β -1,3 glucanases e quitinases, e a quantidade de micélio presente, conforme ilustrados nas figuras 9, 11, 16, 19, 21 e 23, respectivamente, em folhas inoculadas de materiais de milho resistente e suscetível à <i>E. turcicum</i> . Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno (conforme figura 2)	93
----------	---	----

CARACTERIZAÇÃO DE SÍTIOS DE INFECÇÃO DE *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO (*Zea mays* L.), COM BASE NOS MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

Autor: Eng. Agr^o José Renato Stangarlin

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

RESUMO

A helmintosporiose causada por *Exserohilum turcicum* é uma das doenças mais sérias que ocorrem em folhas de plantas de milho (*Zea mays* L.). O progresso desta doença, característica de clima tropical, ocorre principalmente pelo aumento no tamanho das lesões e não em seu número. Essas lesões, com características variáveis, que dependem do genótipo da interação patógeno-hospeiro, representam os sítios de infecção. Dessa forma, o trabalho realizado objetivou caracterizar esses sítios de infecção com base em mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa expressos pela planta, bem como verificar diferenças entre as respostas de defesa em materiais resistente e suscetível ao patógeno.

Plantas das linhagens de milho F64A e F352, suscetível e resistente a *E. turcicum* foram cultivadas em câmara-de-crescimento com fotoperíodo de 14 h de luz e temperatura de 25 °C. Após 14 dias, a 4^a folha verdadeira de cada planta foi inoculada com uma suspensão de 1×10^4 esporos/ml do patógeno crescido em meio sólido do tipo LCH por 14 dias no escuro e à 25 °C. As amostragens foram realizadas a diferentes intervalos de tempo durante as primeiras 48 h após a inoculação, para observação do desenvolvimento do fungo nos tecidos e da ocorrência de lignificação. Amostras também foram obtidas 12 dias após a inoculação, para verificar: o

conteúdo de compostos fenólicos, as atividades de β -1,3 glucanases, quitinases e fenilalanina amônia-liase, as atividades e o padrão isoenzimático de peroxidases, a presença de compostos fungitóxicos *in vitro* e a quantificação do fungo nos tecidos através de dosagem de ergosterol.

Os resultados obtidos mostraram que no material resistente, o sítio de infecção (denominado de sítio de infecção primário) é representado por sintomas do tipo pontos cloróticos resultantes da penetração do patógeno nos vasos do xilema e restrita colonização nos tecidos do mesófilo ao redor, verificando-se a ocorrência de lignificação, acúmulo de compostos fenólicos e atividade acentuada de β -1,3 glucanases e quitinases. No material suscetível há dois tipos de sítios de infecção. No primeiro (sítio de infecção primário), representado por sintomas do tipo pontos cloróticos, o patógeno penetra os vasos do xilema e há moderada colonização dos tecidos do mesófilo ao redor, verificando-se atividades moderadas de β -1,3 glucanases e quitinases. Após a formação do sítio de infecção primário, o patógeno cresce pelo interior dos vasos do xilema e coloniza intensamente os tecidos do mesófilo distantes do ponto de penetração, resultando no sítio de infecção secundário e na formação de lesões necróticas, onde se verifica o acúmulo de compostos fenólicos e atividades moderadas de β -1,3 glucanases e quitinases.

**CHARACTERIZATION OF INFECTION SITES OF *Exserohilum turcicum*
(Pass.) Leonard & Suggs IN DIFFERENT MAIZE GENOTYPES (*Zea mays*
L.), BASED UPON PLANT DEFENSE MECHANISMS**

Author: Eng. Agrº José Renato Stangarlin

Adviser: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

SUMMARY

Northen leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* is one of the most important diseases in maize plants. The progress of this tropical disease occurs mainly by increases in lesion size instead of numbers. Lesions, which exhibit variable characteristics depending upon the host-parasite interaction, represent the infection sites. Thus, the present work was carried out to characterize these infection sites on maize leaves based on structural and biochemical defense mechanisms as well as to study these mechanisms in resistant and susceptible plants to *E. turcicum*.

The maize inbreds F64A e F352, susceptible and resistant to *E. turcicum*, respectively, were grown in growth chambers under a photoperiod of 14 h of light at 25 °C. After 14 days, the 4th leaf of each plant was inoculated with a conidium suspension (1×10^4 spores/ml) of the pathogen grown on LCH media. Leaf tissue was sampled at different time intervals during the first 48 h after inoculation, in order to follow fungal development and lignification in the tissue. Samples were also obtained 12 days after inoculation to measure the amount of phenolic compounds, and activities of β -1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase, besides the activity and electrophoretic pattern of peroxidases in the tissues. These tissue samples were also used to test for the presence of fungitoxic compounds through *in vitro* bioassays and to

determine the amount of fungal biomass inside the leaf using ergosterol analysis.

The results showed that in the resistant maize inbred, the infection site (called "primary infection site") was represented by chlorotic spots due to the penetration and growth of the fungus in the xylem vessels and restricted colonization of the mesophyll cells around it. The restriction of fungal colonization was accompanied by host tissue lignification, increases in phenolic compounds and high β -1,3 glucanase and chitinase activities. In the susceptible inbred there were two types of infection sites. The first one, the primary infection site, was represented by chlorotic spots, due to pathogen penetration and colonization of the xylem vessels, resulting in moderate β -1,3 glucanase and chitinase activities. After the formation of the primary infection site, the pathogen kept growing inside the xylem vessels and was able to heavily colonize the mesophyll tissue far away from the penetration area, given rise to the "secondary infection site" characterized by the production of necrotic lesions, exhibiting increases in the content of phenolic compounds and moderate activity of β -1,3 glucanase and chitinase.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), tanto no Brasil como em outros países, é uma cultura tradicional e que merece relevado destaque pelo fato de ser importante fonte de proteína vegetal, obtida em plantações comerciais ou mesmo de subsistência, além de ser largamente utilizado para a produção de óleos comestíveis e composição de silagens para a alimentação animal (PARTENIANI, 1980).

A “queima das folhas” ou helmintosporiose, causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) K.J. Leonard & E.G. Suggs, considerado um patógeno de clima tropical (BERGER, 1973), mostra-se como uma das numerosas doenças às quais o milho está sujeito (FANTIN et al., 1991). A doença pode reduzir a produção e a qualidade de uma lavoura em zonas onde se registrem alta umidade e moderada temperatura durante o ciclo do cultivo, principalmente quando a infecção coincide com a época de floração (SHURTLEEF, 1980; ULLSTRUP, 1952). Além da redução da produção devido à destruição de tecido fotossintético, a helmintosporiose também influi na maior suscetibilidade dos tecidos aos patógenos causadores de podridão do colmo (BALMER & PEREIRA, 1987). Conforme HUGHES & HOOKER (1971), a helmintosporiose é uma das doenças mais sérias que ocorrem em folhas de plantas de milho. No Brasil a doença ocorre de forma generalizada, com severidade variável na região centro-sul do país (FROSI, 1991) e com características de uma epidemia típica de clima tropical (BERGER, 1973).

Epidemias de regiões tropicais e epidemias de regiões temperadas apresentam, em sua estrutura, uma série de aspectos diferentes. O progresso de uma doença tipicamente temperada, como a ferrugem do milho causada por *Puccinia sorghi*, se faz graças ao estabelecimento de novas lesões, e toda estratégia de controle desta doença (controle químico protetor e obtenção de resistência vertical) tem por objetivo evitar que novas lesões se estabeleçam (BERGAMIN FILHO, 1995). Patógenos tropicais, como *Exserohilum turcicum* em milho, utilizam outras táticas no progresso da doença, sendo que esta se dá principalmente pelo aumento no tamanho das lesões e não em seu número (BERGER, 1973). Dessa forma, a utilização de resistência vertical e controle químico protetor apresentam-se como medidas insuficientes, e mesmo inadequadas para um controle satisfatório de doenças tropicais. Identificar as diferenças estruturais entre epidemias tropicais e temperadas torna-se assim, essencial no estabelecimento do melhor manejo de doenças.

No caso específico da helmintosporiose em milho, a doença se manifesta nas folhas através de lesões necróticas de formato elíptico e alongadas, com comprimento variando de 2,5 a 15 cm e com coloração que pode variar de verde-cinza a marrom em materiais suscetíveis (BALMER, 1980). Em materiais resistentes e moderadamente resistentes as respostas podem variar desde a ausência de sintomas visíveis até a presença de lesões do tipo pontos cloróticos (que não se expandem), pequenas lesões clorótico-necróticas de formato circular ou variando de oval a alongada (que se expandem ou crescem em tamanho) (FROSI & BALMER, 1980). Dessa forma, um patossistema formado por materiais de milho resistente e suscetível ao fungo *E. turcicum* pode fornecer uma excelente ferramenta de trabalho para se tentar caracterizar um sítio de infecção, que estaria representado por diferentes tipos de lesões, de acordo com a compatibilidade ou incompatibilidade de interação.

Diversos mecanismos de defesa da planta podem estar envolvidos nestes tipos de reações em milho, como fatores de resistência

passivos (constitutivos) e ativos (induzíveis), ambos com elementos estruturais ou bioquímicos. Todos esses mecanismos, atuando de forma conjunta, coordenada, e dinâmica, permitem que a planta se defenda do ataque do patógeno, com respostas que variam para as diferentes interações patógeno-hospedeiro, ou em uma mesma interação em função da idade da planta, do órgão ou tecido afetado, do estado nutricional e das condições ambientais (PASCHOLATI & LEITE, 1994), ou mesmo do momento em que esses mecanismos começam a atuar contra o patógeno em um processo infeccioso já estabelecido.

Diante do exposto, o trabalho desenvolvido objetivou caracterizar sítios de infecção de *E. turcicum* com base em mecanismos estruturais (lignificação) e bioquímicos (fenóis e proteínas relacionadas à patogênese) de defesa expressos pela planta de milho, bem como verificar diferenças entre essas respostas de defesa em materiais resistente e suscetível ao patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidemiologia comparativa: doenças de climas tropical e temperado

Realizando-se uma comparação a nível epidemiológico, podemos afirmar que patógenos biotróficos, representando as doenças de clima temperado, são menos aptos ao crescimento de lesões em interações suscetíveis, do que os patógenos necrotróficos, representando as doenças de clima tropical. BERGER (1973) observou que após uma determinada fase da epidemia de *Exserohilum turcicum*, um típico fungo necrotrófico, em milho, a intensidade da doença continuou a aumentar sem que novas lesões aparecessem. Isso foi possível devido ao contínuo crescimento da lesão durante todo o período da epidemia. Uma consequência dessas características é que patógenos biotróficos utilizam em seus mecanismos de infecção grande quantidade de esporos produzidos em pequenas mas numerosas lesões, enquanto os necrotróficos utilizam-se de poucas porém grandes lesões (BERGAMIN FILHO, 1995). Esses fatos poderiam ser explicados pela capacidade individual que cada patógeno teria em ocupar e colonizar um sítio de infecção, visto que ZADOKS (1971) considera que uma cultura seja composta de um grande mas finito número de possíveis sítios de infecção, com áreas iguais e iguais chances de se tornarem infectados. Dessa forma, o sucesso de um patógeno vai depender de quantos sítios de infecção ele conseguir conquistar ao longo do ciclo de cultivo, seja esta conquista pela produção de esporos, liberação, transporte, deposição e penetração em novos sítios (para os patógenos biotróficos), seja por crescimento de micélio dentro

dos tecidos vegetais (para os patógenos necrotróficos) (BERGAMIN FILHO, 1995).

O conceito de sítio de infecção é portanto um fator importante para o correto entendimento desses modelos epidemiológicos.

2.2. Caracterização de sítios de infecção

As dimensões do sítio de infecção podem variar dependendo da combinação patógeno-hospedeiro (ZADOKS, 1971). Para os patógenos de lesão local, o sítio de infecção coincide com o tamanho da lesão. Segundo ZADOKS (1971) a área do sítio de infecção para a ferrugem da folha (*Puccinia recondita* f.sp. *triticea*) em trigo seria de cerca de 4 mm²; para a ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) seria aproximadamente 10 mm². O tamanho de sítios, nestes casos, corresponde aos tamanhos das pústulas. Entretanto, patógenos necrotróficos possuem crescimento extremamente variável, com tamanho final da lesão bem maior que dos patógenos de origem temperada, podendo, no caso de *E. turcicum*, atingir vários centímetros quadrados de área ocupada (BALMER, 1980). De acordo com ZADOKS (1971), muitas penetrações podem ocorrer no local de um sítio de infecção, mas normalmente a lesão é o resultado de apenas um esporo efetivo. A literatura tem demonstrado que mesmo tecidos de plantas consideradas suscetíveis podem se tornar resistentes mediante a aplicação prévia do mesmo patógeno atenuado, ou outro organismo qualquer (DARVILL & ALBERSHEIM 1984; KUC, 1990). O mecanismo de defesa envolvido neste caso parece estar ligado a um sinal químico produzido ou liberado no local da primeira infecção, que transforma as células não afetadas, de suscetíveis em resistentes (KUC, 1982). Dessa forma, o tamanho do sítio de infecção pode estar ligado à difusão espacial e temporal de substâncias dentro dos tecidos, produzidas no ponto da primeira infecção, que protegem uma área ao seu redor contra novas infecções, sem contudo impedir a colonização dos tecidos pelo patógeno já estabelecido.

O sistema de defesa da planta que poderia estar envolvido na caracterização dos sítios de infecção engloba mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência pré e pós-formados, em relação à penetração do patógeno, e que atuam de forma dinâmica e coordenada (PASCHOLATI & LEITE, 1995).

2.3. Mecanismos de defesa da planta

A resistência do hospedeiro a um patógeno pode ser definida sob o aspecto fisiológico como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (GOODMAN et al., 1986; HEITEFUSS & WILLIAMS, 1976). Para atingir esse objetivo a planta utiliza-se de fatores de resistência ou mecanismos de resistência divididos em duas categorias: pré-formados, presentes na planta antes do contato com o patógeno e capazes de reduzir a germinação e penetração do mesmo e consequentemente o número de lesões por folha, e pós-formados, que mostram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno e que interferem no tamanho das lesões e esporulação (HORSFALL & COWLING, 1980; MISAGHI, 1982). Segundo PASCHOLATI & LEITE (1994) esses mecanismos compreendem, por exemplo:

A. Pré-formados (passivos; constitutivos):

- a) estrutural: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;
- b) bioquímico: fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, fototoxinas, quitinases e β -1,3 glucanases.

B. Pós-formados (ativos; induzíveis):

- a) estrutural: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses;
- b) bioquímico: fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PRP).

Alguns desses mecanismos serão discutidos de forma mais detalhada a seguir.

2.3.1. Compostos fenólicos

A expressão compostos fenólicos abrange um extenso grupo de substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos uma hidroxila (EGGER, 1969; RIBÉREAU-GAYON, 1972). Estes compostos incluem: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, α -pirones (coumarinas e isocoumarinas), ligninas, flavonóides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinonas. Em geral, tendem a ser solúveis em água, uma vez que ocorrem freqüentemente na forma de glicosídeos e localizados usualmente nos vacúolos celulares (HARBORNE, 1989). As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos estão muito bem estudadas. As vias do ácido shiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (GRISEBACH, 1981).

Dentre os compostos fenólicos estão as fitoalexinas, que são substâncias químicas produzidas localizadamente pelas células do hospedeiro em resposta à uma infecção microbiana ou a um estímulo abiótico, e que podem inibir o desenvolvimento de um patógeno (SALUNKHE & SHARMA, 1991).

Compostos fenólicos são bem conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (FRIEND, 1981). O efeito inibitório de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção de enzimas varia entre os diferentes grupos de fenóis. Dessa forma, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995). Segundo VIDHYSEKARAN (1988), diversas substâncias fenólicas estão associadas à resistência a doenças. Folhas de cevada inoculadas com *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* acumularam substâncias de natureza aromática, diferentes de lignina, nos sítios de penetração do fungo (MAYAMA & SHISHIYAMA, 1978). A resistência à *Helminthosporium carbonum*

em milho foi caracterizada por um intenso acúmulo de antocianinas (não fungitóxicas, mas originárias de precursores fungitóxicos) ao redor dos sítios de infecção, e a resposta suscetível foi caracterizada pela prevenção da síntese de antocianinas ao redor dos sítios de infecção. Quando o fungo *Helminthosporium maydis* foi inoculado, o mesmo preveniu o acúmulo de antocianinas e fez com que as plantas de milho ficassem suscetíveis à *H. carbonum* (PASCHOLATI & NICHOLSON, 1983; NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). LIM et al. (1968, 1970) trabalhando com extratos de folhas de milho resistente inoculadas com *E. turcicum* encontraram dois compostos fenólicos com atividade semelhante às fitoalexinas e que foram capazes de inibir a germinação dos esporos e reduzir o crescimento dos tubos germinativos do patógeno. Posteriormente, OBI (1979) isolou mais quatro novos compostos de folhas de milho resistentes a *E. turcicum* e inoculadas com o fungo, e que apresentavam estrutura similar àquelas encontradas por LIM et al. (1968, 1970).

Os compostos fenólicos são capazes de inativar enzimas celulolíticas e enzimas pectolíticas, degradadoras da parede celular, produzidas por patógenos (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.

2.3.1.1. Relação entre compostos fenólicos e respostas de defesa das plantas em diferentes patossistemas

Os compostos fenólicos podem estar associados aos sintomas produzidos no hospedeiro. SMITH et al. (1975) mostraram que os níveis de fitoalexinas presentes nos estádios iniciais de infecção foram considerados eficientes em inibir o crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* em feijão,

associado com limitação no desenvolvimento da lesão. As fitoalexinas do tipo deoxiantocianidinas acumulam-se rapidamente em mesocótilos e folhas de sorgo inoculados com microrganismos patogênicos e não patogênicos. Em tecido foliar, a síntese é restrita à área do sítio de infecção, uma zona de duas ou três células correspondendo a aproximadamente 2300 a 2500 μm^2 de área. Entretanto, nos mesocótilos, a síntese é estimulada em uma larga área das células do hospedeiro ao redor do sítio de infecção (HIPSKIND et al., 1990). HAHN et al. (1985), estudando a localização e a quantificação de gliceolina em relação à presença de *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* nas raízes da soja, observaram que concentrações substanciais de fitoalexina estavam presentes em tecidos adjacentes, ainda não colonizados pelo patógeno. Segundo esses autores, um sinal molecular originado do fungo ou da planta, poderia estar se movendo à frente do sítio de infecção.

COUTURE et al. (1973) relataram que a síntese de fenóis totais em milho foi incrementada após a inoculação de plantas isogênicas suscetíveis (ht) e resistentes (Ht) a *E. turcicum*, sendo que 10 dias após a inoculação os níveis de fenóis totais eram maiores no material resistente. HAMMERSCHMIDT & NICHOLSON (1977) diferenciaram materiais de milho resistente e suscetível a *Colletotrichum graminicola* com base no conteúdo de fenóis totais, havendo uma correlação entre a restrição do desenvolvimento da lesão e o acúmulo desses compostos. BAZZALO et al. (1985), trabalhando com plantas de girassol infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, encontraram um forte efeito inibitório do ácido isoclorogênico sobre o crescimento micelial do fungo, bem como um incremento nos níveis de fenóis totais na região da lesão e tecidos ao redor em plantas tolerantes. CONTI et al. (1986) observaram que um dos fatores de resistência de roseiras a *Sphaerotheca pannosa* é a capacidade das plantas em sintetizar grandes quantidades de compostos fenólicos. BASHAN (1986) verificou que compostos fenólicos extraídos de plântulas de algodão infectadas com *Alternaria macrospora* foram capazes de inibir o crescimento do fungo *in vitro*, como também os teores de fenóis totais eram muito maiores nos

materiais resistentes do que nos suscetíveis. DIEHL et al. (1992) mostraram um incremento nos teores dos ácidos fenólicos juglona, isoquercitina e tanino condensado em tecidos de pecã infectados com *Cladosporium carygenum*. CANDELA et al. (1995) verificaram forte efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *Phytophthora capsici* causado pelos ácidos *trans*-cinâmico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico e salicílico encontrados em hastes de *Capsicum annuum* infectadas com esse patógeno.

2.3.2. Proteínas relacionadas à patogênese

A infecção de plantas por fungos, bactérias e vírus, entre outros microrganismos, frequentemente conduz a uma resposta de defesa do hospedeiro através de mecanismos de eficiências variáveis contra o fitopatógeno (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Um dos mais eficientes destes mecanismos é a reação de hipersensibilidade onde há a indução da produção de fitoalexinas e de várias proteínas de defesa codificadas por genes da planta (CARR & KLESSIG, 1990; GRAHAM & GRAHAM, 1991; STINTIZI et al., 1993). Essas proteínas incluem: a) proteínas estruturais - quando incorporadas à matriz extracelular, na tentativa de confinamento do patógeno (ex., enzimas peroxidases envolvidas na lignificação); b) enzimas do metabolismo secundário como as envolvidas na biossíntese de antibióticos; e c) proteínas relacionadas à patogênese (proteínas RP), responsáveis pelas maiores mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel durante as respostas de defesa (STINTIZI et al., 1993).

Essas proteínas RP foram detectadas pela primeira vez no início da década de 70 em folhas de fumo Samsun NN exibindo reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico (TMV)(VanLOON & VanKAMMEN, 1970). Este foi o sistema que permitiu a caracterização da maior parte das proteínas RP até agora conhecidas, embora algumas dessas proteínas também possam ser induzidas em plantas sob condição de estresse, recebendo neste caso a denominação de proteínas de estresse (LINTHORST, 1991).

Na reação de hipersensibilidade há o fenômeno da complementariedade entre gene de virulência do patógeno e gene de resistência da planta, havendo a formação de lesões necróticas ao redor do sítio inicial de ataque do patógeno, restringindo-o a essa região. Nessa região pode haver o acúmulo de derivados da via metabólica dos fenilpropanóides, de fitoalexinas, carboidratos (calose), glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, polímeros aromáticos como lignina e outros fenóis além das proteínas RP (BAILEY & MANSFIELD, 1982; EBEL, 1986).

Algumas das mudanças mencionadas acima podem também ser induzidas à distância do sítio de infecção, em partes não infectadas da planta, como é o caso das proteínas RP, cuja produção em folhas de fumo não inoculadas representa 5-10 % da sua produção em folhas inoculadas e com reação de hipersensibilidade. Essa resposta de defesa sistêmica é acompanhada pelo fenômeno de resistência sistêmica adquirida (RSA), onde partes não infectadas da planta mantêm-se em “estado de alerta” devido ao fato de outras partes da planta já terem reagido hipersensitivamente ao patógeno (ROSS, 1961). Acredita-se que as proteínas RP contribuam para a eficiência da RSA pelo fato de serem induzidas paralelamente a estas, embora isto ainda não tenha sido claramente comprovado. No entanto, elas servem como um sensível marcador para pesquisas sobre um possível “sinal” (ou fator ativo imunizante) que se move dos sítios primários de infecção para áreas distantes (GRAHAM & GRAHAM, 1991).

Resumindo, e como conceito geral, pode-se dizer que as proteínas RP são induzíveis no hospedeiro em resposta à infecção por um patógeno ou por estímulos abióticos, e podem estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno.

As proteínas RP apresentam propriedades físico-química típicas que as distinguem das demais proteínas encontradas em plantas (STINTIZI et al., 1993):

- São estáveis em pH baixos, em torno de 2,8 (quase a totalidade das demais proteínas das plantas precipitariam nesta condição);
- Mostram-se resistentes à ação de enzimas proteolíticas. Desde que as proteínas RP ácidas de fumo localizam-se no espaço intercelular das folhas, que é uma região de pH relativamente baixo devido ao colapso dos tecidos e liberação de ácidos vacuolares e que também contém atividade de protease ácida, parece que essas proteínas RP são bem adaptadas a essa condição;
- Geralmente mostram-se como monômeros, com peso molecular variando entre 8 e 50 kDa;
- Podem estar localizadas no vacúolo, parede celular e/ou apoplasto;
- São estáveis sob altas temperaturas (em torno de 60-70 °C).

As proteínas RP podem se apresentar em forma ácida (positiva) ou básica (negativa) (ponto isoelétrico abaixo ou acima do pH 7,0, respectivamente). Em fumo as proteínas intracelulares (localizadas nos vacúolos) são principalmente básicas e são constitutivamente expressas em altos níveis nas raízes, enquanto as formas ácidas são geralmente extracelulares. Uma diferença que também pode ser observada entre as formas ácida e básica é que estas últimas são induzidas em altos níveis nas folhas por etileno e injúria, enquanto que as primeiras não o são (BOLLER, 1988; KEEFE et al., 1990; MAUCH & STAEHELIN, 1989; NASSER et al., 1988, 1990).

2.3.2.1. Classificação das proteínas RP

As primeiras quatro proteínas RP descobertas foram facilmente detectadas devido à alta mobilidade em gel de poliacrilamida e porque migraram para uma região onde quase não haviam outras proteínas celulares (VanLOOM & VanKAMMEM, 1970). Outras proteínas RP, embora presentes no mesmo gel, não podiam ser distinguidas das demais proteínas com mobilidade similar. O procedimento de extração a baixo pH permitiu eliminar essas outras proteínas celulares e caracterizar mais seis outras bandas de proteínas RP em extratos de folha de fumo com reação de hipersensibilidade a TMV. A

nomenclatura destas dez principais proteínas RP de fumo foi baseada na característica de mobilidade eletroforética relativa: RP-1a, -1b, -1c, -2, -N, -O, -P, -Q, -R e -S, em ordem decrescente de mobilidade (STINTIZI et al., 1993).

Baseado em características serológicas, peso molecular e composição de aminoácidos as proteínas RP de fumo são separadas em cinco grupos (CARR & KLESSIG, 1990; LINTHORST et al., 1990; STINTIZI et al., 1993; VIGERS et al., 1991): **Grupo 1:** compreende as forma ácidas RP-1a, -1b e -1c e a forma básica RP-1g; **Grupo 2:** caracterizado pelas β -1,3 glucanases; **Grupo 3:** caracterizado pelas quitinases; **Grupo 4:** neste grupo estão as proteínas r1, r2 e s2 isoladas de folhas de fumo infectadas com TMV; **Grupo 5:** com dois componentes quase neutros, extracelulares, de massa molecular de 24 kDa (proteína R e S) e dois componentes neutros de massa molecular de 22 kDa e encontrados em vacúolos de células de fumo em resposta a estresse osmótico (osmotina e n-osmotina).

A seguir são discutidos detalhadamente os grupos 2 e 3 (CARR & KLESSIG, 1990; STINTIZI et al., 1993), os quais incluem as enzimas β -1,3 glucanases e quitinases, que fazem parte dos mecanismos bioquímicos pré-formados de resistência das plantas aos fitopatógenos (BOL et al., 1990). Essas enzimas hidrolíticas exibem ação direta nas hifas invasoras (ação fungicida), com a conseqüente liberação de elicitores oligossacarídicos a partir das paredes celulares fúngicas, os quais podem levar à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência nas plantas (BOLLER, 1988) e dessa forma restringir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais.

Grupo 2: este grupo é composto por β -1,3 glucanases (E.C.3.2.1.39). Essas endoglucanases são monômeros com peso molecular entre 25-35 kDa e que produzem oligômeros com 2-6 unidades de glicose a partir do substrato laminarina (uma β -1,3 glucana)(BOL et al., 1990); a β -1,3 glucana é um importante componente da parede celular de muitos fungos (ISAAC, 1992). Muitas glucanases de várias espécies de plantas têm sido clonadas e

sequeenciadas. Em fumo foram isoladas cinco β -1,3 glucanases (quatro isoformas ácidas e uma básica, mais abundante) e agrupadas em três classes. A isoforma básica pertence à classe I, enquanto as isoformas ácidas pertencem às classes II e III. RP-2, -N e -O são da classe II, e a outra enzima extracelular RP-Q é da classe III. As isoformas ácidas são extracelulares enquanto as básicas ocorrem nos vacúolos. Outra β -1,3 glucanase chamada sp41 pode ser encontrada em grande quantidade em órgãos florais específicos.

Não há correlação entre o nível de similaridade na sequência de aminoácidos e a atividade catalítica relativa dessas enzimas sobre o substrato laminarina: RP-2 e -N mostram 99 % de similaridade na sequência de aminoácidos, mas N é cinco vezes mais ativa que RP-2; RP-O é 93 % similar a RP-2 mas é 250 vezes mais ativa. A RP-O tem uma atividade similar à glucanase básica embora a sequência de aminoácidos entre as duas seja muito diferente. Isto aumenta os problemas de diferença em especificidade de substrato entre glucanases para dada espécie de planta e também entre glucanases de diferentes espécies de plantas.

Grupo 3: este grupo é caracterizado pelas **quitinases** (E.C. 3.2.1.14). Semelhante às glucanases, elas são monômeros com peso molecular entre 25 e 35 kDa. As quitinases de plantas caracterizadas até agora são endoquitinases que produzem quito-oligossacarídeos com 2-6 unidades de N-acetilglucosamina (BOL et al., 1990). Algumas dessas endoquitinases purificadas de plantas também possuem atividade de lisozima, podendo hidrolizar ligações β -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina no peptidoglicano bacteriano. Certas quitinases podem agir como quitosanases, além do fato de existirem também quitosanases específicas induzidas em plantas em resposta a fitopatógenos.

Embora as quitinases hidrolizem eficientemente a quitina, que é o principal componente do exoesqueleto de insetos e da parede celular de

muitos fungos (ISAAC, 1992), elas têm sido encontradas em plantas de fumo em resposta à infecção por TMV (PONSTEIN et al., 1994).

2.3.2.2. Indução da produção das proteínas RP

As proteínas RP podem ser induzidas durante a resposta das plantas à infecção (CORDERO et al., 1994; HOOFF et al., 1994; LAMBAIS & MEHDY, 1993; NASSER et al., 1990; OSSWALD et al., 1993; PALVA et al., 1993; VAD et al., 1991), pelo tratamento com diferentes agentes químicos tais como ácido poliacrílico, derivados de aminoácidos, sais de metais pesados, ácido salicílico e poluentes do ar, e também pelo tratamento com alguns fitohormônios como auxina, citocinina, ácido abscísico e etileno (JUNG et al., 1993; MAUCH et al., 1992; NASSER et al., 1990; SCHRAUDNER et al., 1992; VANDAMME et al., 1993).

Há vários exemplos na literatura com relação à indução das proteínas RP por patógenos em diferentes plantas: *Colletotrichum gloeosporioides* - *Stylosanthes guianensis* (BROWN & DAVIS, 1992); vírus do mosaico - fumo (HEITZ et al., 1994; PAN et al., 1992); vírus da necrose do fumo - feijão (REDOLFI et al., 1989); vírus - soja (ROGGERO & PENNAZIO, 1989); *C. lindemuthianum* - feijão (DAUGROIS et al., 1990); *Cladosporium fulvum* - tomate (JOOSTEN et al., 1995); *Didymella applanata* - framboesa (KOZLOWSKA & KRZYWANSKI, 1989); *Ascochyta rabiei* - grão-de-bico (NEHRA et al., 1994); *Cercospora beticola* - beterraba (NIELSEN et al., 1994); *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* - ervilha (MAUCH et al., 1988); *Peronospora tabacina* - fumo (TUZUN et al., 1989); *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pimentão (O'GARRO & CHARLEMANGE, 1994). No caso de fungos, esses vários trabalhos parecem indicar que as formas extracelulares possuiriam uma função imediata na defesa das plantas, pela ação na degradação de hifas invasoras (**ação antimicrobiana direta**), com a conseqüente liberação de elicitores oligossacarídicos a partir das paredes fúngicas, os quais poderiam conduzir à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência

nas plantas (**ação antimicrobiana indireta**) As formas intracelulares poderiam estar atuando tardiamente nas reações de defesa das plantas. Caso as formas extracelulares não fossem capazes de impedir o crescimento do patógeno nos tecidos vegetais ocorreria o colapso da célula e a liberação das formas intracelulares básicas dos vacúolos (BOLLER, 1988).

O sinal para acúmulo sistêmico das proteínas RP é desconhecido, embora existam vários candidatos, como: ácido salicílico, etileno (hormônio vegetal gasoso e muito móvel na planta), sistemina (peptídeo com 18 aminoácidos, móvel por toda a planta e que induz a síntese de inibidores de proteinases em tomate), jasmonato (que atua como regulador vegetal natural na senescência) e potenciais elétricos (GRAHAM & GRAHAM, 1991; YALPANI et al., 1993).

Com relação ao patógeno *E. turcicum*, já foram verificados aumentos na atividade total de β -1,3 glucanase correlacionados com a expressão de resistência dos tecidos de milho a esse fungo (SHIMONI et al., 1992). Em sorgo, as folhas infectadas apresentavam um bem definido halo avermelhado nas lesões necróticas, que restringia o desenvolvimento das mesmas, embora o patógeno ainda continuasse vivo no interior dos elementos traqueais (STANGARLIN et al., 1994). Esse complexo de pigmentos acumulado nas fibras da bainha do feixe era constituído de fitoalexinas do tipo deoxiantocianidina (luteolinidina, apigeninidina e apigeninidina-éster), e exibia atividade de β -1,3 glucanase.

2.3.3. Enzimas associadas aos mecanismos de defesa da planta

Os mecanismos ativos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário (FRIC, 1976). Duas dessas enzimas chaves, a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase serão abordadas.

2.3.3.1. Peroxidase

A enzima peroxidase, a qual está presente nos tecidos das plantas (HOAGLAND, 1990), em certas células animais (LÜCK, 1965) e em microrganismos (KOSUGUE, 1969), é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância. Ela cataliza a oxidação e a eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina (GASPAR et al., 1982). As peroxidases participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno (MISAGHI, 1982; ISIGHE et al., 1993), da oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta à infecção (FRY, 1986), oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (HOAGLAND, 1990) e na biossíntese de lignina (HARKIN & OBST, 1973; ABELES & BILES, 1991; INTAPRUK et al., 1994.).

Mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas: feijão - *Uromyces viciae-fabae* (BONATTI et al., 1994); melão - *Colletotrichum lagenarium* (GRAND & ROSSIGNOL, 1983); batata - *Erwinia carotovora* (LOJKOWSKA & HOLOBUWSKA, 1992); fumo - vírus da necrose do fumo (TNV) (MONTALBINI et al., 1995); trigo - *Erysiphe graminis* (PATYKOWSKI et al., 1988); melão - *Sphaerotheca fugilinea* (REUVENI & BOTHMA, 1985); tomate - *Verticillium dahliae* (REUVENI & FERREIRA, 1985); alface - *Bremia lactucae* (REUVENI et al., 1991); *Brassica juncea* - *Macrophomina phaseolina* (SRIVASTAVA, 1987); feijão - vírus do mosqueado do amendoim (PMV) (WAGIH, 1993); fumo - *Peronospora tabacina* (YE et al., 1990).

2.3.3.1.1. Características das peroxidases

As peroxidases (Doador: H_2O_2 Oxiredutase, E.C. 1.11.1.7) são específicas para o aceptor de hidrogênio, sendo ativos somente metil, etil e

peróxidos, mas inespecíficas para os doadores de hidrogênio, que podem ser fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos (BERGMEYER et al., 1974).

As peroxidases são glicoproteínas (FRY, 1986) com peso molecular em torno de 40 kDa (BERGMEYER et al., 1965), conhecidas como enzimas de “função dupla”, pois são capazes de gerar o H_2O_2 que lhes servirá de substrato (AKAZAWA & CONN, 1958).

Danos na membrana plasmática da célula, causados por ruptura mecânica ou ação de enzimas proteolíticas, ativam as peroxidases que são proteínas de membrana (SANCHES-FERRER et al., 1989; REIMMANN et al., 1992). Peroxidases possuem grande afinidade por paredes ou outros componentes celulares (ABELES & BILES, 1991), podendo, durante o processo de lignificação, ficarem aderidas à parede celular ou na membrana envolvida na síntese de lignina.

O envolvimento das peroxidases em diferentes processos fisiológicos em uma planta superior indicam a atuação de diferentes isoenzimas que podem ser separadas em formas ácidas e básicas por eletroforese, cromatografia de troca iônica ou focalização isoelétrica (GASPAR et al., 1982). Em milho, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, HAMILL & BREWBAKER (1969) observaram 24 isoenzimas em extratos obtidos de 250 variedades. GRISON & PILET (1985) relataram 11 isoperoxidases na fração citoplasmática extraída de raízes de milho e LUSSO (1989) encontrou 10 isoenzimas em extratos de folhas de milho inoculadas com *Helminthosporium carbonum*, *H. maydis* ou injuriadas mecanicamente com carborundo.

2.3.3.1.2. Relação entre peroxidases, fenóis e ligninas

Como já dito anteriormente, as peroxidases catalizam reações de um grande número de compostos, entre eles os fenóis. Como exemplos dessa oxidação tem-se: oxidação de vanilina produzindo dehidrovanilina, a do pirogalol produzindo purpurogalina e do catecol produzindo o-benzoquinona

(SAUNDERS et al., 1964). A ação das peroxidases sobre o guaiacol leva à formação do tetraguaiacol (MAEHLY & CHANCE, 1954). Os fenóis acoplados oxidativamente são formados a partir de fenóis simples pela ação das peroxidases (FRY, 1984).

Com relação à biossíntese de lignina, um polímero complexo formado principalmente de unidades de fenilpropanóides (FREUNDENBERG, 1965), as peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina (GOODMAN et al., 1986). Esse polímero, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores (SALISBURY & ROSS, 1978), funciona como uma barreira física à penetração fúngica (BELL, 1981; NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992; PASCHOLATI & LEITE, 1994; VANCE et al., 1980). Segundo RIDE (1978), a lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais através de várias maneiras: a) estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e ao crescimento do patógeno; b) modificação da parede celular tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas; c) aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos e impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor.

Diversos trabalhos têm mostrado o envolvimento das peroxidases com a lignificação de papilas (SHERWOOD & VANCE, 1980; RIDE, 1983; CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; KERBY & SOMERVILLE, 1992; OLIVEIRA, 1994; OLIVEIRA et al., 1995), bem como a presença de peroxidases nessas estruturas (CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; VANCE et al., 1976). A papila é um espessamento da parede celular sob o apressório fúngico, desenvolvendo-se como uma estrutura de formato cônico a partir da parede celular epidérmica em direção ao interior celular (SHERWOOD & VANCE, 1980). É constituída de calose e muitas contêm lignina e outros derivados fenólicos, celulose e silicone (AIST, 1983). É considerada uma das mais notáveis respostas morfológicas da célula vegetal à tentativa de invasão

fúngica (AIST, 1983; RIDE, 1983). Plantas de milho inoculadas com *C. graminicola*, *H. maydis* e *H. carbonum* respondem à tentativa de penetração do fungo com a formação de papilas (CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; PASCHOLATI et al., 1985).

SHIMONI et al. (1991) observaram a atividade de peroxidases em folhas de milho exibindo suscetibilidade diferencial a *E. turcicum*. Plantas não inoculadas apresentaram alta atividade enzimática em folhas do material resistente, quando comparado com o material suscetível. Após a inoculação, houve aumento da atividade de peroxidases em ambos os materiais, mas com padrões isoenzimáticos diferentes.

2.3.3.2. Fenilalanina amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (FAL) (E.C. 4.3.1.5) é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em plantas (GROSS, 1980), devido a importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos e estabilidade e facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos (CAMM & TOWERS, 1977).

Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estarão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (EBEL & HAHNBROCK, 1982). A FAL já foi isolada de algas, fungos e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células bacterianas ou tecidos animais (CAMM & TOWERS, 1977).

2.3.3.2.1. Características da enzima

A enzima FAL isolada de milho possui peso molecular entre 306 e 330 kDa, e consiste de quatro subunidades com pesos moleculares de aproximadamente 83 kDa (HAVIR & HANSON, 1973), e apresenta pH ótimo de

reação em torno de 8,7, quando o substrato é L-fenilalanina (HANSON & HAVIR, 1972).

Pode estar localizada nos cloroplastos das células vegetais, principalmente nas membranas tilacóides, embora não demonstre atividade em cloroplastos de células do mesófilo. A FAL pode ainda estar associada com carboidratos, que as protegeriam contra a inativação (HAVIR, 1979).

A atividade da FAL *in vitro* pode ser reduzida pelos ácidos *trans*-cinâmico, 4-coumárico, cafêico, sinápico e tri-iodo benzóico (JANGAARD, 1974). Por outro lado, injúria nos tecidos, e portanto estímulo à produção de etileno endógeno, causa um incremento na atividade da enzima (CHALUTZ, 1973).

2.3.3.2.2. FAL e a biossíntese de compostos fenólicos

Os mesmos fatores que influem na atividade de FAL também influem 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). Em milho, há correlações entre o acúmulo de antocianina e fenóis totais nos tecidos e níveis de FAL (DUKE & NAYLOR, 1974).

A atividade de FAL tem sido estudada em interações planta-patógeno envolvendo vírus (VEGETTI et al., 1975), bactéria (PUROSHOTHAMAN, 1974), nematóides (CHYLINSKA & KNYPL, 1975) e fungos, onde estão a grande parte dos trabalhos (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).

Outros exemplos de trabalhos, envolvendo o estudo da FAL em interações planta - patógeno fúngico, são listados: aveia - *Erysiphe graminis* f. sp. *avenae* (CARVER et al., 1994); cevada - *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (CLARK et al., 1994); cevada - *Bipolaris sorokiniana* (PELTONEN &

KARJALAINEN, 1995); cevada - *E. graminis* f.sp. *hordei* (raça1 - patógeno) e *Erysiphe pisi* (não patógeno) (SHIRAIISHI et al., 1995); trigo - *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* (SOUTHERTON & DEVERALL, 1990).

2.4. Quantificação de fungos em tecidos vegetais através do ergosterol

O ergosterol é o principal componente da membrana fúngica (ISAAC, 1992), não fazendo parte dos tecidos vegetais e permitindo uma excelente quantificação da biomassa do fungo que está colonizando a planta (SEITZ et al., 1977, 1979). Dessa forma é possível estabelecer uma correlação entre as respostas de defesa da planta em determinadas regiões da folha e a presença ou não do fungo nestes tecidos.

A estimativa da quantidade de micélio fúngico presente nos tecidos vegetais poderia ser realizada também através de métodos envolvendo a análise de quitina, um componente da parede celular fúngica (ISAAC, 1992). No entanto, métodos envolvendo a determinação de quitina em tecidos vegetais infectados por fungos são muito laboriosos e com menor especificidade e sensibilidade quando comparados com métodos envolvendo a determinação de ergosterol através de cromatografia líquida de alta pressão (JOHNSON & MCGILL, 1990).

O método de dosagem do ergosterol pode ser amplamente utilizado para se quantificar a colonização de raízes por fungos micorrízicos (MARTIN et al., 1990; JOHNSON & MCGILL, 1990; NYLUND & WALLANDER, 1992; SALMANOWICZ & NYLUND, 1988) e determinar a extensão da invasão fúngica em cereais e sementes armazenadas, mesmo que o fungo não esteja mais viável, o que impediria a utilização de outros métodos que envolvem a incubação das sementes para crescimento do fungo contaminante (SEITZ et al., 1977, 1979; GORDON & WEBSTER, 1984). Pode ainda ser usado para quantificar a biomassa fúngica no solo (DAVIS & LAMAR, 1992) e o crescimento fúngico em substratos sólidos (MATCHAM et al., 1984).

O método de dosagem do ergosterol já foi utilizado também em estudos envolvendo a reação de materiais vegetais resistentes à infecção com o patógeno. GRIFFITHS et al. (1985) realizaram um bioensaio com ergosterol para verificar a resistência de folhas de trigo a *Septoria nodorum*. GRETENKORT & INGRAM (1993) utilizaram o ergosterol como uma medida quantitativa da resistência de cultura de tecidos de *Brassica napus* sp. *oleifera* a *Leptosphaeria maculans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os experimentos foram realizados em condições de ambiente controlado, utilizando as linhagens de milho F64A e F352, suscetível e resistente, respectivamente, à *E. turcicum*, fornecidas pela empresa AGROCERES.

Para maximizar a velocidade de emergência e garantir uniformidade de plantas, foram utilizadas sementes pré-germinadas. Para tanto, estas receberam uma desinfecção superficial prévia por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% (produto comercial:água 1 + 2 partes, v/v) durante 10 a 15 min, após rápida imersão em álcool etílico comercial. A seguir, as sementes foram mantidas em água destilada à temperatura ambiente para hidratação. Decorridas 18 h, as sementes foram transferidas para placas de Petri contendo papel de filtro umedecido, sendo incubadas 2 dias a 25 °C no escuro, para germinação (VITTI, 1995). As sementes pré-germinadas foram plantadas em vasos de alumínio contendo 1,5 l de uma mistura de solo com matéria orgânica autoclavados. As plantas assim obtidas, foram mantidas em câmara-de-crescimento (14 h de luz e temperatura constante de 25 °C) por 14 dias.

3.2. Obtenção, manutenção e inoculação de *E. turcicum*

Foi utilizado um isolado obtido a partir de lesões de plantas de milho infectadas naturalmente e que se encontravam no campo experimental do Departamento de Fitopatologia (ESALQ/USP). O fungo foi cultivado em meio de cultura do tipo LCH (lactose - caseína hidrolizada)(MALCA & ULLSTRUP, 1962), a 25-28 °C no escuro, durante 14 dias. Os conídios utilizados para inoculação foram provenientes de terceira repicagem do fungo em meio de cultivo. Após a terceira repicagem, foi realizado novo isolamento através de coleta de conídios de lesões de folhas, inoculadas com o mesmo isolado, e colocadas em câmara-úmida por uma noite. Esta técnica foi utilizada para se garantir uma virulência uniforme do patógeno entre os diferentes ensaios, pois o cultivo prolongado em meio de cultura pode acarretar perda da mesma (NELSON, 1976).

Os conídios de *E. turcicum* foram obtidos através de lavagem das culturas fúngicas em placas de Petri contendo meio de LCH, com 14 dias de idade, utilizando-se água com Tween 20 (1 gota em 300 ml) (THAKUR et al., 1989). A suspensão obtida foi filtrada através de duas camadas de gaze (PEDERSEN et al., 1986) e ajustada a diferentes concentrações (0; 5×10^1 , 5×10^2 ; 5×10^3 e 5×10^4 conídios/ml). As suspensões obtidas foram aspergidas com pulverizador manual sobre toda a 4ª folha de plantas de milho com 14 dias de idade (2,0 ml de suspensão/folha inoculada). As plantas inoculadas permaneceram em câmara-úmida e escuro por 20 horas, após o que foram mantidas sob fotoperíodo de 14 horas de luz e temperatura constante de 22 °C. Para cada tratamento foram utilizados 3 vasos com 5 plantas cada. Concomitante à inoculação das plantas, foi realizado teste de germinação *in vitro* dos conídios da suspensão utilizada, a qual foi aspergida sobre lâmina de microscopia contendo 2 ml de agar-água 1% (PASCHOLATI et al., 1983). A lâmina foi colocada em placa de Petri, com algodão embebido em água destilada, e deixada no escuro a 22 °C durante 20 h. O crescimento do fungo

foi paralizado com azul algodão de lactofenol e a contagem dos conídios germinados realizada ao microscópio ótico.

3.3. Ensaio de cinética de crescimento das lesões

A obtenção de plantas, suspensão de esporos (1×10^4 conídios/ml) e inoculação seguiram os procedimentos descritos em 3.1. e 3.2., respectivamente. Constatados os primeiros sintomas, foram efetuadas avaliações a cada 24 h, tomando-se o número e o tamanho das lesões determinadas na 4ª folha verdadeira. A área das lesões foi calculada pela fórmula $(A \times B) \times (\pi/4)$, onde A e B representam respectivamente, o comprimento e a largura da lesão (KOCHMAN & BROWN, 1975).

O crescimento das lesões também foi avaliado com o uso de microcâmara-de-inoculação (BERGSTROM & NICHOLSON, 1983)(**Figura 1**). Para tanto, o inóculo (1×10^4 esporos/ml) foi colocado em três poços alternados, utilizando-se 20 µl de suspensão de esporos/poço, os quais foram vedados com fita adesiva para manutenção da umidade. Após 24 h sob escuro constante, as microcâmaras-de-inoculação foram retiradas e as plantas deixadas em condição de fotoperíodo (14 h de luz e temperatura constante de 25 °C). Constatados os primeiros sintomas, foram efetuadas avaliações a cada 24 h, anotando-se a quantidade e o tamanho das lesões determinadas na 4ª folha verdadeira.

3.4. Curva de desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais

A obtenção das plantas, suspensão de esporos (1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 e 1×10^4 conídios/ml) e inoculação foram conduzidos conforme descrito em 3.1. e 3.2., respectivamente. A diferentes intervalos de tempo após a inoculação, foram retiradas amostras das folhas (discos com 1 cm de diâmetro) que foram colocados em lâminas de microscopia com azul algodão de lactofenol, observando-se posteriormente em microscópio ótico a germinação,

formação de apressórios, penetração e colonização dos tecidos (STANGARLIN & PASCHOLATI, 1994).

3.5. Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos

A obtenção das plantas, suspensão de esporos (1×10^4 conídios/ml) e inoculação seguiram os procedimentos descritos em 3.1. e 3.2., respectivamente.

Amostras de seções de tecido vegetal (representadas na **Figura 2**) foram coletadas 12 dias após a inoculação, pesadas e homogeneizadas em almofariz de porcelana com 3,75 ml de metanol 80% acidificado (0,1% HCl). O homogeneizado resultante foi centrifugado (12.000 g por 5 min) e o sobrenadante filtrado através de papel Whatman nº 1. O filtrado foi então evaporado em roto-evaporador à vácuo (40 °C) e, em seguida, ressuspenso em 2,0 ml de água destilada. Esse material foi particionado contra hexana até que toda a clorofila fosse removida. A fase aquosa foi coletada, evaporada sob pressão reduzida para retirada de resíduos de hexana e o volume completado com água destilada para 2,5 ml.

Alíquotas de 150 µl dos extratos aquosos obtidos conforme descrito acima, foram acrescidas de 1,5 ml de carbonato de sódio 2%. Após 5 min adicionou-se às amostras, sob agitação constante, 150 µl de solução aquosa de reagente de Folin-Ciocalteu 2N diluído em água destilada (1:1; v/v) (BRAY & THORPE, 1954). Como referência foi utilizado água destilada em substituição aos extratos aquosos. A concentração de fenóis em cada amostra, expressa em termos de equivalente µg de ácido clorogênico por grama de peso fresco (Eq. µg ác.clor. / g.p.f.), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ácido clorogênico em água destilada variando de 50 a 450 µg/ml em função de sua absorbância a 750 nm (**Figura 8**)(LOPEZ & PASCHOLATI, 1992). Todas as leituras foram efetuadas 30 min após a adição

do reagente de Folin-Ciocalteu. Foram efetuadas três repetições de cada amostra.

3.6. Determinação das atividades de quitinases e β -1,3 glucanases

Extração de proteínas - As amostras de tecido vegetal (aproximadamente 30 mg de peso fresco), foram obtidas conforme descrito em 3.1. e 3.2.. Foram utilizadas regiões específicas da folha coletadas 12 dias após a inoculação com o patógeno (Figura 2). Essas amostras foram homogeneizadas mecanicamente em almofariz de porcelana na presença de 4,0 ml de tampão acetato 100 mM (pH 5,0)(tampão de extração), com posterior centrifugação (20.000 g, 25 min, 4°C). Os sobrenadantes foram colocados em membrana de diálise (limite de exclusão molecular 20.000) e concentradas a 4°C com polietilenoglicol 20.000. Após 2 h, o resíduo no interior das membranas foi ressuspenso para 2,5 ml, usando-se o mesmo tampão de extração. Esta fração foi utilizada para se avaliar a atividade enzimática e o teor de proteínas.

Atividade de quitinases - A atividade de quitinases foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de "CM-chitin-RBV" (WIRTH & WOLF, 1990) de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta ("CM-Chitin-RBV"). Para tanto, 200 μ l do extrato proteico foram misturados com 600 μ l do mesmo tampão de extração e 200 μ l de "CM-Chitin-RBV" (2,0 mg/ml). Após incubação por 20 min a 40 °C, a reação foi paralizada com a adição de 200 μ l de solução de HCl 1,0 M, seguida de centrifugação por 5 min a 5.000 g a 4 °C. A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada tendo-se tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância / min / mg de proteína, descontando-se os valores de absorbância do controle (800 μ l de tampão de extração + 200 μ l de "CM-Chitin-RBV").

Atividade de β -1,3 glucanases - A atividade de β -1,3 glucanases nas amostras foi determinada pela quantificação colorimétrica de glicose liberada de

laminarina, através do uso da hidrazida do ácido *p*-hydroxibenzóico (HAPHB) (LEVER, 1972). A mistura da reação, incubada a 40 °C por 1 h, continha 50 µl do tampão de extração, 200 µl do extrato proteico e 250 µl de laminarina (4,0 mg/ml) (ABELES & FOENCE, 1970). Após esse período, foram acrescentados 1,5 ml de uma solução de HAPHB (0,5 g dissolvido em 10 ml de HCl 0,5 M, acrescido de 50 ml de NaOH 0,5 M), sendo em seguida essa mistura aquecida a 100 °C por 5 min. Após resfriamento em gelo até a temperatura de 30 °C, as amostras tiveram a absorbância determinada a 410 nm, contra tampão de extração. Subtraiu-se de cada amostra o valor do controle (esse controle correspondia a uma mistura idêntica à da amostra, mas sem incubação prévia). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose (**Figura 18**) e os resultados expressos em µg de glicose / min / mg de proteína.

3.7. Determinação da atividade de fenilalanina amônia-liase

A FAL foi extraída de amostras representando regiões específicas da folha (Figura 2) obtidas após 12 dias da inoculação com o patógeno (conforme descrito em 3.1. e 3.2.), por uma modificação dos métodos de DUKE & NAYLOR (1976), segundo PASCHOLATI et al. (1986) e PELTONEN & KARJALAINEN (1995). As amostras, com aproximadamente 30 mg de peso fresco, foram homogeneizadas em 5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,5)(tampão de extração) contendo 2% de polivinilpolipirrolidona insolúvel (PVP) e 15 mM de mercaptoetanol, em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g por 35 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram colocados no interior de membrana de diálise (limite de exclusão molecular 20.000), sendo concentrados a 4°C com polietilenoglicol 20.000. Após 2 h, o resíduo no interior das membranas foi ressuspenso para 2,5 ml usando-se o mesmo tampão de extração. Este extrato foi utilizado para se avaliar a atividade enzimática e o teor de proteínas.

A atividade de FAL foi determinada por medida espectrofotométrica direta, pela conversão de L-fenilalanina para ácido *trans*-

cinâmico a 290 nm a 37 °C . A mistura da reação continha 250 µl de extrato de folhas de milho e 1.250 µl de uma solução 0,2% de L-fenilalanina. A cubeta referência continha 1.250 µl de uma solução 0,2% de L-fenilalanina e 250 µl de tampão de extração. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para o ácido *trans*-cinâmico (**Figura 10**) e os resultados foram expressos como atividade específica: µmol ácido *trans*-cinâmico / min / mg proteína.

3.8. Determinação da atividade de peroxidases

Foram utilizados aproximadamente 30 mg de tecido fresco de folhas de milho, obtidas conforme descrito em 3.1. e 3.2.. Essas amostras representavam regiões específicas da folha (Figura 2), sendo obtidas 12 dias após a inoculação com o patógeno. Regiões do terço médio das folhas inoculadas também foram coletadas a 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 72 e 120 h após a inoculação. As amostras foram homogeneizadas em 4 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)(tampão de extração) em almofariz de porcelana. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g durante 25 min. O sobrenadante obtido foi considerado como a fração contendo as peroxidases solúveis e armazenado a 4 °C para a posterior determinação da atividade enzimática e conteúdo proteico. Todo o processo de extração das peroxidases foi conduzido a 4 °C (LUSSO, 1989).

A atividade das peroxidases foi determinada à 30 °C, através de método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da reação consistiu de 2,9 ml de uma solução contendo 250 µl de guaiacol e 306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 0,1 ml de preparação enzimática. A cubeta de referência consistiu de 3,0 ml de solução contendo 250 µl de guaiacol e 306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A reação foi seguida em

espectrofotômetro a 470 nm. Os resultados foram expressos em Δ unidades de absorvância / min / mg de proteína.

3.9. Caracterização isoenzimática das peroxidases

Amostras de tecido vegetal de aproximadamente 30 mg de peso fresco representando diferentes regiões das folhas de milho (Figura 2), coletadas 12 dias após a inoculação com o patógeno, sofreram o mesmo processo de extração para peroxidases descrito em 3.8.. Os sobrenadantes foram colocados em membrana de diálise (limite de exclusão molecular 20.000) e concentrados a 4°C com polietilenoglicol 20.000. Após 2 h, o resíduo no interior das membranas foi ressuspenso para 0,5 ml usando-se o mesmo tampão de extração contendo 10% de glicerol. As amostras tiveram a concentração proteica ajustada pelo método de BRADFORD (1976) e então utilizadas na eletroforese. Também foi utilizada amostra obtida a partir de micélio de *E. turcicum* cultivado por 14 dias em meio líquido do tipo LCH, sob agitação e escuro constantes e temperatura de 25 °C. O procedimento para extração das peroxidases fúngicas foi o mesmo utilizado para as amostras vegetais.

A eletroforese anódica em gel de poliacrilamida foi conduzida utilizando-se equipamento de eletroforese vertical da Bio-Rad ("Mini Protean II"). O gel de poliacrilamida utilizado foi de 4% (gel concentrador) e 10% (gel de corrida). Como tampão de corrida utilizou-se Tris-glicina pH 8,9 (0,75 g Tris + 3,6 g glicina em 1.000 ml de água destilada). Como corante de corrida utilizou-se o azul de bromofenol a 0,25%. Após a aplicação das amostras, a placa foi mantida a 4 °C sob voltagem constante de 80 V até o final da corrida, quando então aplicou-se mais 2 μ l do corante de corrida (no "poço" destinado ao corante), interrompendo-se a eletroforese quando este atingiu a metade da placa.

Para a visualização das bandas de peroxidase, o gel foi imerso por 30 min em 100 ml de solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0)

contendo 3,3 mM de guaiacol e 1 ml de peróxido de hidrogênio/100 ml do tampão (LUSSO, 1989). Após a coloração, o gel foi fixado em ácido acético 7% por 15 min e armazenado em água destilada.

3.10. Determinação do conteúdo total de proteínas

O teste de BRADFORD (1976) foi empregado para a quantificação do conteúdo total de proteínas. Para tanto foram adicionados a cada 0,8 ml de amostra 0,2 ml de reagente de Bradford concentrado. Após 5 min, realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm.

A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes μg de albumina de soro bovino (ASB) em 0,8 ml de amostra (μg proteína / 0,8 ml) foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 25 μg / 0,8 ml (**Figura 12**).

3.11. Quantificação de ergosterol nos tecidos inoculados

O método para a quantificação do ergosterol foi baseado nos trabalhos de GRIFFITHS et al. (1985), com algumas modificações. Amostras de tecido vegetal (em torno de 30 mg de peso fresco) obtidas conforme descrito em 3.1. e 3.2., representando regiões específicas da folha (**Figura 2**) foram coletadas 12 dias após a inoculação com o patógeno, homogeneizadas em 5,0 ml de acetona p.a. a -5°C e filtradas em papel de filtro Whatman nº 1. Logo após, o resíduo no papel de filtro foi lavado novamente com mais 5,0 ml de acetona. Esse papel de filtro contendo o resíduo dos tecidos vegetais foi deixado secar à temperatura ambiente por alguns minutos (para a evaporação da acetona). O resíduo, representando o pó cetônico, foi colocado em tubo de ensaio onde foram adicionados 4 ml de etanol 95% a 4°C e aproximadamente 10 mg de ácido pirogálico. O material foi deixado em condição de geladeira por 1 h, quando então adicionou-se 0,8 ml de KOH 60% (peso/volume) para se realizar a saponificação a 100°C por 20 min. O material saponificado recebeu 2,0 ml de água destilada, sendo então particionado duas vezes com hexana. As

frações de hexana foram evaporadas a 60 °C. O precipitado resultante foi ressuspenso em 1,0 ml de metanol p.a. e filtrado em filtro descartável para seringa (0,45 µm). Estes extratos metanólicos foram analisados através de cromatografia líquida ("HPLC") usando-se coluna Supelcosil LC-18 (15,0 cm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 ml de etanol p.a./min. O tempo de retenção do ergosterol, com base na absorbância a 282 nm, foi de aproximadamente 4,3 min. Os valores obtidos foram plotados em curva padrão para ergosterol comercial, e comparados com valores de ergosterol para a cultura pura do fungo *E. turcicum* (curva com 0, 1, 5 e 10 mg de peso seco de micélio - **Figura 22**). O micélio foi obtido a partir de cultura do patógeno crescido em meio líquido do tipo LCH, sob escuro, agitação constante e temperatura de 25 °C. Após 14 dias, o micélio produzido foi seco em estufa a 50 °C até peso constante.

3.12. Testes histoquímicos para a presença de lignina

Para os testes histoquímicos, epidermes de folhas de milho obtidas conforme em 3.1. e 3.2. foram retiradas com lâmina de barbear a diferentes intervalos de tempo após a inoculação com o patógeno (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48, 72 e 120 h) e coradas por 3 min com azul de o-toluidina (O'BRIEN et al., 1964) para a observação microscópica indicativa da presença de lignina. Após esse período, o excesso de corante foi retirado em água destilada e o material montado em lâmina de microscopia com glicerol a 20% para observação ao microscópio ótico.

Também foram realizados cortes transversais, com lâmina de barbear, de amostras coletadas 12 dias após a inoculação para se verificar a presença de micélio do patógeno no interior dos vasos do xilema.

3.13. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de tecido vegetal, obtidas conforme descrito em 3.1. e 3.2., foram coletadas 12 dias após a inoculação com o patógeno, fixadas em FAA (formalina:ácido acético: etanol 50°, 5:5:90, v/v/v) durante 48 h e transferidas para etanol 60° e 70°. As amostras foram seccionadas transversalmente com lâmina de barbear e desidratadas em série etanólica gradual (80°, 90° e 3 vezes em 100°), durante 30 min em cada série. Em seguida, o material foi seco em aparelho de secagem ao ponto crítico (Balzers CPD 030) com CO₂, montados em “stubs” com fita carbono dupla face e metalizados com ouro em evaporador (MED 010 Balzers Union) durante 150 s. A observação foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (DSM 940A Zeiss) sob aceleração de 10kV.

3.14. Bioensaio para frações fungitóxicas presentes nos extratos dos tecidos inoculados

Extratos metanólicos, obtidos conforme descrito em 3.5., dos tecidos vegetais, representando regiões específicas da folha (Figura 2) coletadas após 12 dias da inoculação com o patógeno, foram utilizados para a cromatografia de camada delgada (“TLC”) em placas de sílica-gel 60 com indicador fluorescente (254 nm), pré-lavadas com clorofórmio/metanol (1:1, v/v). Amostras (volume equivalente a 0,04 g de tecido fresco) foram colocadas sobre as placas e secas sob fluxo de ar. A separação dos compostos foi obtida usando butanol / ácido acético / água (6:1:2,v/v/v), como sistema de solvente. Os compostos foram visualizados sob luz ultravioleta a 365 e 254 nm (LOPEZ & PASCHOLATI, 1992).

A seguir, as placas de sílica-gel secas contendo as bandas individuais foram aspergidas com suspensão de esporos de *E. turcicum* (10⁶ esporos/ml de meio líquido Czapeck) e incubadas sob umidade relativa de 100% a 25 °C, no escuro (MARTINS et al., 1986). Depois de 48 horas, as

placas foram observadas para a presença de zonas de inibição ao redor das bandas individuais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais

Os dados representados na **Figura 3** referem-se ao desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais a partir de inoculação com suspensão de esporos de 1×10^4 conídios/ml. Para as suspensões com 1×10^1 , 1×10^2 e 1×10^3 esporos/ml não se obteve resultados conclusivos devido ao número reduzido ou mesmo à ausência de conídios nos tecidos amostrados.

A porcentagem de germinação dos conídios foi praticamente igual para ambos os materiais resistente e suscetível, com valor máximo em torno de 80% 24 h após a inoculação (a porcentagem de germinação *in vitro* desses esporos foi de 93%, valor este que se manteve constante para todas as suspensões de conídios utilizadas nos demais experimentos, os quais foram realizados somente com a concentração de 1×10^4 esporos/ml). Embora a formação de apressórios tenha sido 13% maior no material resistente em relação ao suscetível 12 h após a inoculação, é interessante observar que há um atraso na penetração do patógeno no material resistente 18 h após a inoculação. Considerando-se que no tempo 18 h a penetração no material resistente é 16% menor em relação ao suscetível e que nos tempos 12 e 24 h os valores são praticamente iguais para ambos os materiais, pode-se sugerir que este atraso na penetração seria em torno de 12 h. Este detalhe é muito importante visto que o tamanho do sítio de infecção pode estar ligado à difusão

espacial e temporal de substâncias dentro dos tecidos (KUC, 1982), conforme será comentado posteriormente.

Esse tipo de penetração direta nas folhas de milho com formação de apressório na superfície foliar e *peg* de penetração subcuticular é comum para o fungo *E. turcicum* (KNOX-DAVIES, 1974).

4.2. Cinética de crescimento das lesões

Os resultados estão representados na **Figura 4**. Os primeiros sintomas apareceram 24 h após a inoculação na forma de pontos cloróticos, com aproximadamente 0,25 mm² de área, tanto no material suscetível quanto no resistente (Figuras 4.A e 4.C, respectivamente). Esses pontos cloróticos correspondem aos pontos de penetração do patógeno, como discutido anteriormente (item 4.1., Figura 3). Um ponto que se apresentava isolado ou afastado dos demais, de tal forma que após seu desenvolvimento não houvesse problema de coalescência com outros pontos, foi marcado e acompanhado o seu crescimento diariamente.

A expansão desses pontos marcados foi pequena e praticamente igual para ambos os materiais durante os 14 dias de avaliação, período a partir do qual as folhas começaram a entrar em senescência. O mesmo se observou para todos os demais pontos que não estavam marcados. Porém, no material suscetível, 11 dias após a inoculação surgiram lesões necróticas em regiões onde não haviam sido observados nenhum ponto clorótico. Essas lesões relativamente grandes (80 vezes maiores) se comparadas com os pontos cloróticos apresentaram velocidade de crescimento bastante elevada, sendo observadas em média 3 lesões necróticas por folha inoculada (Figura 4.B). A presença de pontos cloróticos e lesões necróticas caracterizando a reação de suscetibilidade da linhagem F64A ao patógeno, está de acordo com os resultados obtidos por VITTI (1993).

O número de pontos cloróticos por folha inoculada (Figuras 4.B e 4.D) foi praticamente igual em ambos os materiais, o que está de acordo com a porcentagem de penetração do fungo nos tecidos da planta (Figura 3.C).

O fato das lesões necróticas no material suscetível surgirem em regiões da folha que não haviam sido previamente marcadas, tornava difícil caracterizar o sítio de infecção desde o momento inicial da inoculação até o aparecimento dos sintomas, uma vez que não se podia determinar quais pontos de penetração eram os responsáveis pela formação das lesões. Para contornar esse problema foram utilizadas microcâmaras-de-inoculação (Figura 1). Os resultados estão ilustrados na **Figura 5**. Apesar do inóculo ter sido colocado em regiões determinadas das folhas, a lesão necrótica que surgiu no material suscetível 11 dias após a inoculação, não estava relacionada aos pontos de deposição do patógeno e nem aos pontos cloróticos observados nessas regiões. Em alguns casos, essas lesões estavam afastadas até 10 mm do local onde o inóculo foi depositado. Com o crescimento da lesão esta terminava por atingir o local de inoculação. No material resistente, novamente, formaram-se apenas pontos cloróticos. A expansão desses pontos cloróticos foi semelhante à observada quando da inoculação por aspersão em toda a folha (Figuras 4.A e 4.C).

Considerando-se que os esporos vieram exclusivamente das suspensões utilizadas, pois não houve vazamento de inóculo dos poços onde foi depositado, poderia-se considerar que o fungo penetra a folha e cresce internamente nos tecidos até causar o colapso dos mesmos, quando então surge a lesão no material suscetível. As observações feitas ao microscópio ótico (**Figura 6**) e eletrônico (**Figura 7**) mostram a presença de hifas do fungo no interior dos elementos traqueais do xilema, o que explica o surgimento de lesões no material suscetível em locais afastados dos pontos de inoculação. HILU & HOOKER (1964) mostraram que o crescimento de *E. turcicum* em materiais de milho resistente é fortemente limitado a uma pequena área do tecido do mesófilo, embora o tecido do xilema seja penetrado, enquanto que

em materiais suscetíveis a hifa penetra e cresce rapidamente pelos vasos do xilema, para somente mais tarde colonizar os tecidos do mesófilo e produzir a lesão necrótica. STANGARLIN et al. (1994) também verificaram a presença de hifas do patógeno *E. turcicum* no interior dos elementos traqueais do xilema de folhas de sorgo, um tecido morto por onde o fungo poderia se desenvolver sem que os mecanismos de defesa da planta fossem ativados.

Deve-se observar que no material resistente também há a presença de hifas no interior dos elementos do xilema (Figura 7.C). No entanto, o atraso na penetração do fungo neste material resistente e a presença de outros mecanismos de defesa da planta, que serão discutidos a seguir, podem contribuir para que os sintomas se expressem apenas na forma de pontos cloróticos. TRESE & LOSCHKE (1990) também observaram a presença de micélio de *E. turcicum* em vasos do xilema de plantas de milho em interações compatíveis e incompatíveis, não verificando diferenças no crescimento fúngico para essas duas interações 3 dias após a infecção. Esses autores ainda descrevem dois tipos de sítios de infecção: um primeiro tipo, onde somente os pequenos vasos são colonizados pelo micélio, e outro, onde tanto os pequenos quanto os grandes vasos são colonizados, sendo que este segundo tipo de colonização ocorre somente em 16% dos sítios de infecção, os quais seriam os responsáveis pela formação das lesões. Segundo LEVY (1991) essa frequência de infecção (porcentagem de sítios inoculados que desenvolvem lesões) para *E. turcicum* em milho pode variar de 17 a 95% dependendo das condições ambientais, genótipo do hospedeiro e raças do patógeno.

A partir desses resultados, as amostragens de tecido para estudo dos possíveis mecanismos de defesa da planta de milho à *E. turcicum* passaram a ser realizadas 12 dias após a inoculação. As diferentes regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Com esse procedimento, podia-se coletar amostras que representavam a reação final da interação planta-patógeno, o que contribuiria para a melhor caracterização dos mecanismos de defesa envolvidos nos sítios de infecção.

4.3. Compostos fenólicos, atividade de fenilalanina amônia-liase e frações fungitóxicas

Compostos fenólicos - A concentração de compostos fenólicos no material resistente foi menor em relação ao suscetível (**Figura 9**). Neste último, o acúmulo de compostos fenólicos ocorre de maneira acentuada na região da lesão e no tecido verde ao redor desta. BAZZALO et al. (1985) encontraram incrementos significativos de fenóis na região da lesão e tecido sadio ao redor em plantas de girassol infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. CANDELA et al. (1995) mostraram que as células vivas adjacentes às lesões necróticas causadas por *Phytophthora capsici* em plantas de pimentão eram as responsáveis pela produção dos ácidos fenólicos relacionados à resistência. Esses acúmulos de fenóis podem ocorrer visto que, na região da lesão e próxima a esta, no material suscetível, a colonização pelo patógeno ocasiona grande destruição de células e estímulo à produção dessas substâncias. No material resistente, o fungo fica restrito à região dos pontos cloróticos ou interior dos vasos do xilema. MOZZETTI et al. (1995) mostraram que o acúmulo da fitoalexina capsidiol em folhas de pimentão infectadas com *P. capsici* estava mais relacionada ao avanço da colonização pelo patógeno do que com a resistência do hospedeiro.

Apesar desses resultados (Figura 9), é comum encontrarmos na literatura maiores teores de compostos fenólicos em materiais resistentes a patógenos. HAMMERSCHMIDT & NICHOLSON (1977) mostraram que o conteúdo de compostos fenólicos aumentou após a inoculação de *C. graminicola* em materiais de milho suscetível, resistente e resistente com hipersensibilidade. Entretanto, nestes dois últimos o incremento ocorreu 48 h antes e foi de 74 e 110%, respectivamente, maior que o incremento ocorrido no material suscetível. O conteúdo total de fenóis no material suscetível só aumentou após o início da formação e expansão de lesões necróticas visíveis.

Atividade de fenilalanina amônia-liase - Com relação à atividade da FAL (**Figura 11**), praticamente não há diferenças entre os tecidos amostrados no material resistente, o qual apresenta níveis de atividade ligeiramente maiores em relação aos tecidos suscetíveis. No entanto, o conteúdo de fenóis no material resistente foi menor, embora a FAL seja a principal enzima envolvida no metabolismo fenólico. Provavelmente, as diferenças na atividade dessa enzima no material resistente, para os diferentes tecidos amostrados, estivessem presentes apenas no momento inicial da infecção. SHIRAISHI et al. (1995) encontraram incrementos na atividade de FAL em cevada infectada com *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* apenas durante a tentativa de penetração pelo tubo germinativo primário e formação de apressórios. TENA & VALBUENA (1983) verificaram maior incremento inicial na atividade de FAL em plantas de girassol resistentes a *Plasmopora halstedii*, seguido de rápido declínio da atividade com o passar do tempo. Na cultivar suscetível, o incremento inicial foi menor mas manteve-se constante com o tempo. Mesmo comportamento foi observado por GREEN et al. (1975) em cultivares de trigo inoculados com *E. graminis* f.sp. *tritici*. Em alguns casos, durante o processo infeccioso, pode não haver incremento na atividade da FAL, mas sim, em outras enzimas do metabolismo de fenólicos. DICKERSON et al. (1984) não encontraram nenhuma mudança na atividade da FAL em mesocótilos de plantas de milho resistente e suscetível à *H. maydis*, embora incrementos na atividade da CoA ligase, enzima envolvida na síntese de compostos fenólicos, tenham sido verificados em resposta à infecção.

No material suscetível, os tecidos inoculados apresentaram maior atividade em relação ao controle, havendo concordância entre maior quantidade de compostos fenólicos produzidos e maior atividade dessa enzima na região da lesão. PELTONEN & KARJALAINEN (1995) verificaram que a maior atividade da FAL estava associada com o momento de formação de lesões necróticas em folhas de cevada infectadas com *Bipolaris sorokiniana*, enquanto que no material resistente o pico de atividade ocorria somente

durante o crescimento do tubo germinativo do patógeno sobre a superfície foliar.

Frações fungitóxicas - No bioensaio para a detecção de frações fungitóxicas presentes nos extratos dos tecidos de milho inoculados (**Figura 13**), parece haver também a presença de compostos inibindo o desenvolvimento de *E. turcicum*. As bandas com valor de Rf 0,62 na região SA (sadio), TV (tecido distante dos pontos cloróticos) e PC (pontos cloróticos), coletadas do material resistente, exibiram efeito fungitóxico ao patógeno. LOPEZ & PASCHOLATI (1992) em bioensaio para fungitoxicidade a *Cladosporium cucumerinum*, utilizando complexo de pigmentos extraídos de mesocótilos de sorgo inoculados ou injuriados, encontraram banda (Rf 0,61) com atividade antifúngica e tendo compostos fenólicos como alguns dos componentes.

4.4. Atividade de peroxidases

Na **Figura 14** observa-se a atividade de peroxidases em função do tempo nos materiais suscetível e resistente, bem como a porcentagem de atividade nos tecidos doentes desses materiais em relação aos controles não inoculados. Ambos os materiais apresentaram comportamento muito semelhante, com acréscimo acentuado na atividade de peroxidases a partir de 18 h da inoculação, coincidindo com o tempo onde se observa a maior porcentagem de formação de apressórios (**Figura 3.B**). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987), que encontraram incrementos acentuados na atividade dessa enzima a partir do momento de maior porcentagem de formação de apressórios de *Helminthosporium maydis* em folhas de plantas de milho suscetível e resistente. SOUTHERTON & DEVERALL (1990) também encontraram incrementos na atividade de peroxidases durante a formação dos primeiros haustórios por isolados virulentos e avirulentos de *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* em cultivares de trigo resistentes.

Embora a peroxidase seja a enzima final para a síntese de lignina, os testes histoquímicos não exibiram a ocorrência de lignificação no material suscetível (resultados não ilustrados), que mostrou atividade enzimática semelhante ao material de milho resistente. Neste porém, é possível se observar a deposição de lignina junto aos pontos de penetração do patógeno em amostragens realizadas 24 e 48 h após a inoculação (**Figura 15**). Em trabalhos realizados por ANGRA-SHARMA & SHARMA (1994), com folhas de plantas de milho resistente e suscetível, coloridas com azul de o-toluidina, não houve lignificação em ambos os materiais infectadas com *H. maydis*.

Com relação à atividade de peroxidase em amostragens realizadas 12 dias após a inoculação (**Figura 16**), pode-se notar que praticamente não há diferenças na atividade enzimática entre as regiões SA e TV para ambos os materiais. No material suscetível, a maior atividade verificada na região HA poderia estar contribuindo para a contenção do desenvolvimento da lesão (região LE). A maior atividade foi encontrada na região PC do material suscetível, o que poderia explicar o não crescimento desses pontos ou mesmo a não formação de lesões a partir desses pontos cloróticos. BASHAN (1986) também mostrou que a atividade de peroxidase e polifenoloxidase foi maior ao redor das áreas necróticas causadas por *Alternaria macrospora* em plântulas de algodão.

Nessas regiões amostradas de folhas de milho, a atividade de peroxidase é maior no material suscetível em relação ao resistente. Resultados semelhantes ou não a este podem ser encontrados na literatura. REUVENI & FERREIRA (1985) verificaram que a taxa de incremento na atividade de peroxidase em folhas e raízes de tomate infectadas com *Verticillium dahliae* foi maior em plantas suscetíveis do que em plantas resistentes. SHIMONI et al. (1991) detectaram alta atividade de peroxidase em material de milho resistente em relação ao suscetível antes da inoculação com *E. turcicum*. Seis dias após a inoculação houve incremento na atividade em ambos os materiais, embora o surgimento das lesões tenha ocorrido somente 4 dias mais tarde.

O padrão isoenzimático dessas peroxidases (**Figura 17**) mostrou a presença de 3 isoenzimas, com valores de RM de 0,14, 0,18 e 0,22, em todas as regiões amostradas. Nas regiões HA, LE e PC (esta última tanto no material resistente quanto no suscetível) exibiram mais duas isoenzimas com valores de RM de 0,25 e 0,27. Houve relação entre a maior atividade de peroxidases nas regiões HA, LE e PC (**Figura 16**) e maior concentração de isoenzimas presentes nestes tecidos, conforme mostram os gráficos de densitometria (**Figura 17.B**). Não foi detectada nenhuma isoenzima de peroxidase a partir de extrato de micélio fúngico. Portanto, o padrão isoenzimático e a alta atividade de peroxidase nas regiões HA, LE e PC é devido somente às isoenzimas produzidas pela planta. SHIMONI et al. (1991) trabalhando com milho e *E. turcicum* encontraram 6 isoenzimas, sendo que 3 isoenzimas presentes no material resistente não infectado não estavam presentes no material suscetível também não infectado.

4.5. Atividade de quitinases e β -1,3 glucanases

Na **Figura 19** verifica-se que no material suscetível, semelhantemente ao observado para as peroxidases, as maiores atividades dessas enzimas hidrolíticas estão nas regiões da lesão (LE) e tecido verde ao redor (HA), porém, em quantidades acentuadamente menores quando comparadas no total com as encontradas no material resistente. Neste último, a atividade é bastante elevada em tecidos distantes (TV) dos pontos cloróticos, nesses pontos (PC) e mesmo em tecidos sadios não inoculados (SA). A ocorrência de altas concentrações de β -1,3 glucanase constitutiva e sua produção após a infecção, já foram observadas em outras interações planta-patógeno incompatíveis (BROGLIE et al., 1991; KIM & HWANG, 1994; NEHRA et al., 1994) e em casos de resistência sistêmica adquirida (KUC, 1982; ROSS, 1961). Em experimentos com milho e *E. turcicum*, SHIMONI et al. (1992) encontraram maior atividade de β -1,3 glucanase no material resistente após a

infecção, no qual os níveis constitutivos dessa enzima eram maiores do que os níveis produzidos no material suscetível após a infecção.

A atividade de quitinase para alíquotas de 200 µl da fonte enzimática (valor que permitiu maior atividade enzimática - **Figura 20**) foi expressa em unidades de absorbância / min / mg de proteína. A **Figura 21** mostra que a atividade dessa enzima foi praticamente igual nos três tecidos amostrados do material resistente, e com valor maior se comparado com os valores encontrados para o material suscetível. Neste as regiões TV, HA, LE e PC mostram valores mais elevados em relação ao tecido sadio (SA).

Essas duas enzimas hidrolíticas fazem parte dos mecanismos bioquímicos pré e pós-formados de defesa das plantas (PASCHOLATI & LEITE, 1994). Na região sadia (SA) do material de milho resistente, observa-se a presença de β -1,3 glucanase e quitinase com valores altos de atividade, em torno de 700 e 230%, respectivamente, maiores em relação à mesma região no material suscetível (Figuras 19 e 21). Após a inoculação com o patógeno ocorre a indução da síntese dessas enzimas, principalmente nas regiões HA, LE e PC no material suscetível e PC no material resistente. Essas são as regiões onde há maior quantidade de micélio fúngico presente, o que pode ser observado pela **Figura 23**. Essa figura representa a quantidade de micélio presente nos tecidos vegetais, com base na quantidade de ergosterol detectada em cada amostra (**Figura 22**). A quitina e a β -1,3 glucana, fazendo parte da parede celular de fungos imperfeitos, basidiomicetos e ascomicetos (ISAAC, 1992), podem ser degradadas por essas enzimas constitutivas. A degradação libera monômeros que funcionam como elicitores para a indução da síntese de maiores quantidades de β -1,3 glucanase e quitinase (BOLLER, 1988), no local onde está o patógeno ou à distância, como ocorre nas regiões de tecido verde distante da lesão ou dos pontos cloróticos (TV).

A **Tabela 1** representa um sumário dos dados referentes ao acúmulo de compostos fenólicos, atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidases, β -1,3 glucanases e quitinases, e a quantidade de micélio presente nos tecidos amostrados, conforme ilustrados nas figuras 9, 11, 16, 19, 21 e 23, respectivamente.

4.6. Relação entre os resultados obtidos e o conceito de lesão virtual

Segundo BASTIAANS (1991), a redução na atividade fotossintética em uma folha doente ocorre pela redução da área verde no local da lesão visual, bem como pelas alterações produzidas no metabolismo da área verde remanescente. Essa região aparentemente sadia, mas com alteração nas taxas de fotossíntese, é chamada de lesão virtual. LEVY & LEONARD (1990) também verificaram que a eficiência fotossintética em plantas de milho infectadas com *E. turcicum*, é reduzida devido à destruição do tecido foliar fotossintetizante, e também devido à redução na assimilação de CO₂ no tecido foliar adjacente à lesão.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que além das lesões visuais do tipo necrótica e pontos cloróticos, em ambos os materiais suscetível e resistente, que reduzem o tecido verde fotossintetizante, outras regiões aparentemente saudias têm seu metabolismo alterado. As regiões de tecido verde distante das lesões necróticas ou dos pontos cloróticos e os tecidos verdes ao redor das lesões necróticas mostraram o acúmulo de compostos fenólicos, proteínas RP e atividade de enzimas peroxidases e fenilalanina amônia-liase, indicando uma alteração do padrão de expressão gênica. Essa alteração poderia levar à síntese de compostos específicos que direta ou indiretamente alterariam o metabolismo de carboidratos, responsável pelo fornecimento de energia para essas reações metabólicas.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pôde-se concluir:

- a) Na interação linhagem de milho resistente (F352) e *E. turcicum*, o sítio de infecção (aqui denominado sítio de infecção primário) é representado por sintomas do tipo pontos cloróticos resultantes da penetração do patógeno nos vasos do xilema e restrita colonização nos tecidos do mesófilo ao redor;
- b) Por sua vez, na interação linhagem de milho suscetível (F64A) e *E. turcicum* há dois tipos de sítios de infecção. No primeiro tipo (sítio de infecção primário) representado por sintomas do tipo pontos cloróticos, o patógeno penetra os vasos do xilema e há moderada colonização dos tecidos do mesófilo ao redor. Após a formação do sítio de infecção primário, o patógeno cresce pelo interior dos vasos do xilema e coloniza intensamente os tecidos do mesófilo à distância do local de penetração, resultando no sítio de infecção secundário e na formação de lesões necróticas;
- c) O sítio de infecção primário na linhagem resistente pode resultar do processo de lignificação, acúmulo de compostos fenólicos e atividade acentuada de β -1,3 glucanases e quitinases;

- d) O sítio de infecção primário na linhagem suscetível pode resultar da atividade moderada de β -1,3 glucanases e quitinases;
- e) O sítio de infecção secundário na linhagem suscetível pode resultar do acúmulo de compostos fenólicos e da atividade moderada de β -1,3 glucanases e quitinases.
- f) Finalmente, o acúmulo de compostos fenólicos, proteínas RP e atividades das enzimas peroxidases e fenilalanina amônia-liase em regiões aparentemente sadias das folhas inoculadas com *E. turcicum*, indicam uma alteração do seu padrão de expressão gênica e metabolismo, enquadrando-se no conceito de lesão virtual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELES, F.B. & BILES, C.L. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, Lancaster, **85** : 269-273, 1991.
- ABELES, F.B. & FOENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β -1,3 glucanase in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, Lancaster, **45**:395-400, 1970.
- AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. In: BAILEY, J.A. & DEVERALL, B.J. **The dynamics of host defense**. Sydney, Academic Press, 1983. p. 33-70.
- AKAZAWA, T.; CONN, E.E. The oxidation of reduced pyridine nucleotides by peroxidase. **Journal of Biologic Chemistry**, Baltimore, **232** : 403-415, 1958.
- ANGRA-SHARMA, R. & SHARMA, D.K. Biochemical and histological studies on susceptible and resistant maize leaves infected by *Helminthosporium maydis*. **Plant Pathology**, Oxford, **43**:972-978, 1994.
- BAILEY, J.I.A. & MANSFIELD, J.W. **Phytoalexins**. Blackie, Glasgow and London, 1982.
- BALMER, E. & PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E. & VIEGAS, G.P. (ed.). **Melhoramento e produção do milho**. 2a. ed. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v. 2, p.595-634.
- BALMER, E. Doenças do milho. In: GALLI, F.(ed.). **Manual de Fitopatologia - doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1980. v.2, p. 371-91.
- BASHAN, Y. Phenols in cotton seedlings resistant and susceptible to *Alternaria macrospora*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **116** : 1-10, 1986.

- BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, St. Paul, **81**: 611-615, 1991.
- BAZZALO, M.E.; HEBER, E.M.; DEL PERO MARTINEZ, M.A.; CASO, H.O. Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on the fungus. **Pythopathology Zeitschrift**, Berlin, **112** : 322-332, 1985.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review Of Plant Pathology**, **32** : 21-81, 1981.
- BERGAMIN FILHO, A. A epidemia como um sistema. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 574-601.
- BERGER, R.D. *Helminthosporium turcicum* lesion numbers related to numbers of trapped spores and fungicides sprays. **Phytopathology**, St. Paul, **63** : 930-933, 1973.
- BERGMEYER, H.U.; GAWEHN, K.; GRASSL, M. Enzymes as biochemical reagents. In: BERGMEYER, H.U. (ed.) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2a. ed., New York, Academic Press, 1974, p. 494-495.
- BERGMEYER, H.U.; KLOTZSCH, H.; MÖLLERING, H.; NELBÖCK-HOCHSTETTER, M.; BEAUCAMP, K. Biochemical reagents. In: BERGMEYER, H.U. (ed.) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2a. ed. New York, Academic Press, 1965. p.990-991.
- BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. Microhumidity chamber for quantitative inoculation of attached corn leaves with fungal pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, **73**(7):1040-1042, 1983.
- BIEHN, W.L.; KUC, J.; WILLIAMS, E.B. Accumulation of phenols in resistant plant-fungi interactions. **Phytopathology**, St Paul, **58** : 1255-1260, 1968.
- BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M.; CONELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis - related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, **28** : 113-138, 1990.
- BOLLER, T. Extracellular location of chitinases in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **33** : 11-16, 1988.

- BONATTI,P.M.; LORENZINI,G.; FORNASIERO,R.B.; NALI,C.; SGARBI,E.
Cytochemical detection of cell wall bound peroxidase in rust infected broad bean leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **140** : 319-325, 1994.
- BRADFORD,M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72** : 248-254, 1976.
- BRAY,H.G. & THORPE,W.V. Analysis of phenols compounds of interest in metabolism. **Methods of Biochemical Analysis**, **1**: 27-52, 1954.
- BROGLIE,K.; HOLLIDAY,I.; CRESSMAN,R.; KNOULTON,S.; MALVALI,C.J.; BROGLIE,R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science** **254** :1194-1196, 1991.
- BROWN,A.E. & DAVIS,R.D. Chitinase activity in *Stylosanthes guianensis* systemically protected against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **136** : 247-256, 1992.
- CADENA-GOMEZ,G. & NICHOLSON,R.L. Papilla formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **31**, 51-67, 1987.
- CAMM,E.L. & TOWERS,GHN. Phenylalanine ammonia-lyase. **Progress in Phytochemistry** **4**:169-188, 1977.
- CANDELA,M.E.; ALCÁZAR,M.D.; ESPÍN,A.; EGEA,C.; ALMELA,L. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. **Plant Pathology**, Oxford, **44** : 116-123, 1995.
- CARR,J.P. & KLESSIG,D.F. The pathogenesis-related proteins of plants. **Genetic Engineering - Principles and Methods**. Ed. Jane K. Seltow. Plenum Press. vol II. p. 65-109, 1990.
- CARVER,T.L.W.; ZEYEN,R.J.; ROBBINS,M.P.; VANCE,C.P.; BOYLES,D.A. Suppression of host cinnamyl alcohol dehydrogenase and phenylalanine ammonia-lyase increases oat epidermal cell susceptibility to powdery mildew penetration. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **44** : 243-259, 1994.
- CHALUTZ,E. Ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in carrot roots. **Plant Physiology**, Lancaster, **51** : 1033-1036, 1973.

- CHYLINSKA, K.M. & KNYPL, J.S. Decrease in phenylalanine ammonia-lyase and ribonuclease activity in side roots of carrot infested with the northern root-knot nematode. **Nematologica**, **21** : 129-133, 1975.
- CLARK, T.A.; ZEYEN, R.J.; SMITH, A.G. CARVER, T.L.W.; VANCE, C.P. Phenylalanine ammonia-lyase mRNA accumulation, enzyme activity and cytoplasmic responses in barley isolines, differing at *MI-a* and *MI-o* loci, attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **44** : 171-185, 1994.
- CONTI, G.G.; BASSI, M.; MAFFI, D.; BOCCI, A.M. Host-parasite relationship in a susceptible and a resistant rose cultivar inoculated with *Sphaerotheca pannosa*. II. Deposition rates of callose, lignin and phenolics in infected or wounded cells and their possible role in resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **117** : 312-320, 1986.
- CORDERO, M.J.; RAVENTÓS, D.; SAN SEGUNDO, B. Differential expression and induction of chitinases and β -1,3 glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **7**(1):23-31, 1994.
- COUTURE, R.M.; ROUTLEY, D.G.; DUNN, G.M. Peroxidase activity, β -glucosidase activity and phenolic levels in monogenic resistant (Ht) and susceptible (ht) maize tissues inoculated with *Helminthosporium turcicum*. **Maize Genetics Cooperation Letters**, **47** : 160, 1973.
- DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors. A defence against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, **35**: 243-75, 1984.
- DAUGROIS, J.H.; LAFITTE, C.; BARTHE, J.P.; TOUZE, A. Induction of β -1,3 glucanase and chitinase activity in compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum lindemuthianum* and bean cultivars. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **130** : 225-234, 1990.
- DAVIS, M.W. & LAMAR, R.T. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Grain Britain, **24**(3) : 189-198, 1992.

- DICKERSON,D.P.; PASCHOLATI,S.F.; HAGERMAN,A.E.; BUTLER,L.G.; NICHOLSON,R.L. Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate:CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum*. **Physiological Plant Pathology**, London, **25**: 111-123, 1984.
- DIHEL,S.V.; GRAVES,C.H.; HEDIN,P.A. Cytochemical responses of pecan to *Cladosporium caryenum*: *in situ* localization and quantification of fungitoxic phenols. **Phytopathology**, St Paul, **82**(10) : 1037-1041, 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**, **2** :289-293, 1974.
- DUKE,S.O. & NAYLOR,A.W. Light effects on phenylalanine ammonia-lyase substrate levels and turnover rates in maize seedlings. **Plant Science Letters**, **6** : 361-367, 1976.
- EBEL,J. & HAHLBROCK,K. Biosynthesis. In: HARBORNE,J.B. & MABRY,T.J. (ed.). **The flavonoids: advances in research**. London, Chapman & Hall, 1982. 641-679.
- EBEL,J. Phytoalexins synthesis: the biochemical analysis of the induction process. **Annual Review of Phytopathology**, **24** : 235-264, 1986.
- EGGER,K. Plant phenol derivatives. In: STANL,E.(ed.). **A laboratory handbook**. 2^a ed. Springer-Verlag, New York, 1969. VII(4), 687-706.
- FANTIN,G.M.; SAWAZAKI,E.; BARROS,B.C. Avaliação de genótipos de milho pipoca quanto à resistência à doenças e qualidade da pipoca. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, **17**(2) : 90-99, 1991.
- FREUNDERBERG,K. Lignin: its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols. **Science**, New York, **148** : 595-600, 1965.
- FRIC,F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS,R. & WILLIAMS,P.H. (ed.) **Physiological Plant Pathology**, Berlin, Springer, 1976. p.617-631.
- ✓ FRIEND,J. Plant phenolics, lignification and plant diseases. In: **Progress in Phytochemistry**. **7** : 197-261, 1981.
- FRIEND,J.; REYNOLD,S.B; AVEYARD,M.A. Phenolic metabolism in potato tuber tissue after infection with *Phytophthora infestans*. **Biochemical Journal**, **124** : p.29, 1971.

- FROSI, J.F. & BALMER, E. Reação de linhagens de milho a *Exserohilum turcicum* Pass. em casa-de-vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **5** : 229-238, 1980.
- FROSI, J.F. Níveis de resistência a *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs em milho. Piracicaba, 1991. 96 p. (Doutorado - ESALQ/USP).
- FRY, S.C. Incorporation of (^{14}C) cinnamate into hydrolase-resistant components of primary cell wall of spinach. **Phytochemistry**, Oxford, **23** : 59-64, 1984.
- FRY, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, **37** : 165-186, 1986.
- GASPAR, T.H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**. Geneva, Universidade de Geneva, Centro de Botanique, 1982. 324 p.
- GEBALLE, G.T. & GALSTON, A.W. Wound-induced lignin formation and resistance to cellulase in oat leaves. **Phytopathology**, St Paul, **73** : 613-623, 1983.
- GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K.R. Secondary metabolite. In: Goodman, R.N. (ed). **The Biochemistry and Physiology of Plant Disease**. University of Missouri Press, 1986. Cap. 6, 211-224.
- GORDON, T.R. & WEBSTER, R.K. Evaluation of ergosterol as an indicator of infestation of barley seed by *Drechslera graminea*. **Phytopathology**, St. Paul, **74**(9) : 1125-1127, 1984.
- GRAHAM, T.L. & GRAHAM, M.Y. Cellular coordination of molecular responses in plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**(5) : 415-422, 1991.
- GRAND, C. & ROSSIGNOL, M. Changes in the lignification process induced by localized infection of muskmelons with *Colletotrichum lagenarium*. **Plant Science Letters**, Limerick, **28** : 103-110, 1983.
- GREEN, N.E.; HADWIGER, L.A.; GRAHAM, S.O. Phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. **Phytopathology**, St. Paul, **65** : 1071-1074, 1975.

- GRETENKORT,M.A. & INGRAM,D.S. The use of ergosterol as a quantitative measure of the resistance of cultured tissues of *Brassica napus* ssp. *oleifera* to *Leptosphaeria maculans*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **138** : 217-224, 1993.
- GRIFFITHS,H.M.; JONES,D.J.; AKERS,A. A bioassay for predicting the resistance of wheat leaves to *Septoria nodorum*. **Annals of Applied Biology**, **107** : 293-300, 1985.
- GRISEBACH,H. Lignins. In: CONN,E.E. (ed.) **The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Secondary plant products**. New York, Academic Press, 1981. v. VIII, p.457-478.
- GRISON,R. & PILET,P.E. Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **118** : 189-199, 1985.
- GROSS,G.G. The biochemistry of lignification. **Advances in Botanical Research** **8**:25-63, 1980.
- HADWIGER,L.A.; HESS,S.L.; BROEMBSSEN,J. Stimulation of phenylalanine ammonia-lyase activity and phytoalexin production. **Phytopathology**, St Paul, **60** : 332-336, 1970.
- HAHN,M.C.; BONHOFF,A.; GRISEBACH,H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Plant Physiology**, Bethesda, **77**: 591-691, 1985.
- HAMILL,D.E. & BREWBAKER,J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. IV. The peroxidase isoenzymes of maize (*Zea mays*). **Physiological Plantarum**, Praga, **22** : 945-958, 1969.
- HAMMERSCHMIDT,T.R.; NUCLES,E.M.; KUC,J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology** **20** : 73-82, 1982.
- HAMMERSCHMIDT,R. & NICHOLSON,R.L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. **Phytopathology**, St. Paul, **67** : 251-258, 1977.

- HANSON,K.R. & HAVIR,E.A. Mechanisms and properties of phenylalanine ammonia-lyase from higher plants. **Recent Advances in Phytochemistry**, **4** : 45-85, 1972.
- HARBORNE,J.B. General procedures and measurement of total phenolics. *In*: DEY,P.M. & HARBORNE,J.B. **Methods in plant biochemistry**. San Diego, Academic Press. 1989. vol.1, p. 2-3.
- HARKIN,J.M. & OBST,J.R. Lignification in tree: indication of exclusive peroxidase participation. **Science**, New York, **180** : 296-297, 1973.
- HAVIR,E.A. & HANSON,K.R. L-phenylalanine ammonia-lyase (maize and potato). Evidence that enzyme is composed of four subunits. **Biochemistry**, **12** : 1583-1591., 1973.
- HAVIR,E.A. L-phenylalanine ammonia-lyase. Binding of polysaccharide by the enzyme from maize. **Plant Science Letters**, **16** : 297-304, 1979.
- HEITEFUSS,R. & WILLIAMS,P.H. **Encyclopedia of plant physiology; Physiological plant pathology**. New Series. New York, Springer-Verlag, 1976. v.4.
- HEITZ,T.; FRITIG,B.; LEGRAND,M. Local and systemic accumulation of pathogenesis-related proteins in tobacco plants infected with tobacco mosaic virus. **Molecular Plant Microbe Interactions**, **7**(6) : 776-779, 1994.
- HILU,H.M. & HOOKER,A.L. Host-pathogen relationship of *Helminthosporium turcicum* in resistant and susceptible corn seedlings. **Phytopathology**, St. Paul, **54**: 570-575, 1964.
- HIPSKIND,J.D.; HANAU,R.; LEITE,B.; NICHOLSON,R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of an apigeninidin acyl ester. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **36** : 381-396. 1990.
- HOAGLAND,R.E. Biochemical responses of plants to pathogens. *In*: HOAGLAND,R.E. (ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington, American Chemical Society, 1990. p.87-113.
- HOOF,A.V. LEYKAM,J.; SHAEFFER,J.H. ; WALTOX,D.J. A single β -1,3 glucanase secreted by the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* acts by an exolytic mechanism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **39** : 259-267, 1994.

- HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B. **Plant Disease: an advanced treatise; How plants defend themselves**. New York, Academic Press, 1980. v. 5.
- HUGHES, B.R. & HOOKER, A.L. Gene action conditioning resistance to northern leaf blight in maize. **Crop Science**, Madison, **11** : 180-184, 1971.
- INTAPRUK, C.I.; TAKANO, M.; SHINMYO, A. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Lancaster, **104** : 285-286, 1994.
- ISAAC, S. Fungal-plant interactions. London, Chapman & Hall., 1992. 418 p.
- ISHIGE, F.; MORI, H.; YAMAZAKI, K.; IMASEKI, H. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**, Lancaster, **101**: 193-199, 1993.
- JANGAARD, N.O. The effect of herbicides, plant growth regulators and other compounds on phenylalanine ammonia-lyase activity. **Phytochemistry**, **13**: 1769-1775, 1974.
- JOHNSON, B.N. & MCGILL, W.B. Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to inoculation. **Canadian Journal Forest Research**, **20** : 1125-1131, 1990.
- JOOSTEN, M.H.A.J.; VERBAKEL, H.M.; NETTEKOVEN, M.E.; LEEUWEN, J.; VOSSEN, R.T.M.; WIT, P.J.G.M. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β -1,3 glucanase defence proteins of its host, tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **46** : 45-59, 1995.
- JUNG, J.L.; FRITIG, B.; HAHNE, G. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins. Induction by aspirin (acetylsalicylic acid) and characterization. **Plant Physiology**, Lancaster, **101** : 873-880, 1993.
- KEEFE, D.; HINZ, U.; MEINS, F. The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of α -1,3 glucanase and chitinase in tobacco leaves. **Planta**, **182** : 43-51, 1990.
- KERBY, K & SOMERVILLE, S.C. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. **Plant Physiology**, Lancaster, **100**(1) : 397-402, 1992.

- KIM, Y.J. & HWANG, B.K. Differential accumulation of β -1,3 glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **45** :195-209, 1994.
- KNOX-DAVIES, P.S. Penetration of maize leaves by *Helminthosporium turcicum*. **Phytopathology**, St. Paul, **64**: 1468-1470, 1974.
- KOCHMAN, J.K. & BROWN, J.F. Host and environmental effects on post-penetration development of *Puccinia avenae* and *P. coronata avenae*. **Annual Review of Biology**, Palo Alto, **81** : 33-41, 1975.
- KOSUGUE, T. The role of phenolics in host response to infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **7** : 195-222, 1969.
- KOZLOWSKA, M. & KRZYWANSKI, Z. Chitinase activity in raspberry canes infected with *Didymella applanata* (Niessl) Sacc. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **125** : 165-170, 1989.
- KUC, J. A case for self defense in plants against disease. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, **18**: 3-7, 1990.
- KUC, J. Individual immunity to plant disease. **Bio Science**, Washington, **32**: 854-60, 1982.
- LAMBAIS, M. & 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**, **6** : 75-83, 1993.
- LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry** **47**:273-279, 1972.
- LEVY, Y. Variation in fitness among field isolates of *Exserohilum turcicum* in Israel. **Plant Disease**, St. Paul, **75**: 163-166, 1991.
- LEVY, Y. & LEONARD, K.J. Yield loss in sweet corn in response to defoliation or infection by *Exserohilum turcicum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **128**: 161-171, 1990.
- LIM, S.M.; HOOKER, A.L.; PAXTON, J.D. Isolation of phytoalexins from corn with monogenic resistance to *Helminthosporium turcicum*. **Phytopathology**, St Paul, **60** : 1071-1075, 1970.

- LIM, S.M.; PAXTON, J.D.; HOOKER, A.L. Phytoalexin production in corn resistant to *Helminthosporium turcicum*. **Phytopathology**, St Paul, **58** : 720-721, 1968.
- LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **10**(2) : 123-150, 1991.
- LINTHORST, H.J.M.; BOL, J.E.; CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, **28**: 113-138, 1990.
- LOJKOWSKA, E. & HOLOBOWSKA, M. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **136** : 319-328, 1992.
- LOPEZ, A.M.Q. & PASCHOLATI, S.F. Accumulation of a complex of pigments in sorghum mesocotyls in response to wounding. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **135** : 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**, Lancaster, **68** : 680-685, 1981.
- LÜCK, H. Peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (ed.). **Methods of enzymatic analysis**. 2a. ed., New York, Academic Press, 1965, p. 895-897.
- LUSSO, F.G. Alteração na atividade e no perfil eletroforético da enzima peroxidase em mesocótilos e folhas de milho (*Zea mays* L.) em resposta à inoculação com *Helminthosporium maydis*, raça 0, *Helminthosporium carbonum*, raça 1 e à injúria mecânica. Piracicaba, 1989. 109 p. (Mestrado - ESALQ/USP).
- MAEHLY, A.C. & CHANCE, B. The assay of catalase and peroxidase. In: GLICK, D. (ed.). **Methods of biochemical analysis**. New York, Interscience Publishers. 1954. v. 1, p. 357-408.
- 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 Club**, **89** : 149-159, 1962.
- MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J.L. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, **94**(8) : 1059-1064, 1990.

- MARTIN,J.; GROSSMAN,F. Inhibition of pectic and cellulolytic enzymes of *Rhizoctonia solani* Kuhn and the influence of some inhibitors on the disease process. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **76** : 38, 1972.
- MARTINS,E.M.F.; ROVERATTI,D.S.; MORAES,W.B.C. Elicitation of stress metabolites in coffee leaves by a non-pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **11** : 683-695, 1986.
- MATCHAM,S.E.; JORDAN,B.R.; WOOD,D.A. Methods for assessment of fungal growth on solid substrates. In: **Microbiological Methods for Environmental Biotechnology**, 1984. v. , p. 5-18.
- MAUCH,F. & STAEHELIN,L.A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3 glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, **1** :447-457, 1989.
- MAUCH,F.; MAUCHI-MANI,B.; BOLLER,T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3 glucanase. **Plant Physiology**, Lancaster, **88** : 936-942, 1988.
- MAUCH,F.; MEEHL,J.B.; STAEHELIN,L.A. Ethylene-induced chitinase and β -1,3 glucanase accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. **Planta**, **186** : 367- 375, 1992.
- MAYAMA,S.; SHISHIYAMA,J. Localized accumulation of fluorescent and U.V. absorbing compounds at penetration sites in barley leaves infected with *Erysiphe graminis hordei*. **Physiological Plant Pathology**, London, **13** : 347, 1978.
- MISAGHI,I.J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions**. Plenun Press, 1982. 286 p.
- MONTALBINI,P.; BUONAURO,R.; UMESH KUMAR,N.N. Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and other viruses inducing necrotic and non-necrotic alterations. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **143** : 295-301, 1995.
- MOZZETTI,C.; FERRARIS,L.; TAMIETTI,G.; MATTA,A. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **46**: 95-107, 1995.

- NARAYANASWAMY,P. Phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase in *Alternaria alternata* infected groundnut leaves. **Indian Phytopathology**, New Delhi, **33** : 507-508, 1980.
- NASSER,W.; DE TAPIA,M.; BURKARD,G. Maize pathogenesis-related proteins: characterization and cellular distribution of β -1,3 glucanases and chitinases induced by brome mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **36** : 1-14, 1990.
- NASSER,W.; DE TAPIA,M.; KAUFFAMANN,S.; MONTASSER-KOUHSRI,S.; BURKARD,G. Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize proteins are chitinases. **Plant Molecular Biology**, **11** : 529-538, 1988.
- NEHRA,K.S.; CHUGH,L.K.; DHILLON,S.; SINGH,R. Induction, purification and characterization of chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves and pods infected with *Ascochyta blight*. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, **144**(1) : 7-11, 1994.
- NELSON,R.R. Climatic effects on the incidence of plant disease: the epidemiology of southern corn leaf blight. In: SYMPOSIUM ON CLIMATE & RICE, s.n., Los Baños, 1976. **Proceedings**. Los Baños, IRRI, 1976.
- ✓ NICHOLSON,R.L. & HAMMERSCHMIDT,R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.369-389, 1992.
- ✓ NICHOLSON,R.L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, **21**(1): 95-99, 1995.
- NIELSEN,K.K.; JORGENSEN,P.; MIKKELSEN,D. Antifungal activity of sugar beet chitinase against *Cercospora beticola*: an autoradiographic study on cell wall degradation. **Plant Pathology**, Oxford, **43** : 979-986, 1994.
- NYLUND,J.E. & WALLANDER,H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. In: **Methods in Microbiology**, 1992. v. 24, p. 77-88.
- O'BRIEN,T.P.; FEDER,N.; McCULLY,M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, **59** : 368-373, 1964.

- O'GARRO,L.W. & CHARLEMANGE,E. Comparison of bacterial growth and activity of glucanase and chitinase in pepper leaf and flower tissue infected with *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **45** : 181-188, 1994.
- OBI,I.U. Additional phytoalexin-like compounds in Ht-gene resistance of corn to *Helminthosporium turcicum*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, **92** : 377-381, 1979.
- OLIVEIRA,R.F. Estudo do sistema de defesa constitutivo e induzido de *Mimosa scabrella* contra fungos. Curitiba, 1994. 105 p. (Mestrado - UFP).
- OLIVEIRA,R.F.; PASCHOLATI,S.F.; LEITE,B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hypocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, 1996. (Submetido à publicação).
- OSSWALD,W.F.; SHAPIRO,J.P.; McDONALD,R.E.; NIEDZ,R.P.; MAYER,R.T. Some citrus chitinases also possess chitosanases activities. **Experimentia**, Basel, **49** : 888-892, 1993.
- PALVA,T.K.; HOLMSTRÖM,K.O.; HEINO,P.; PALVA,E.T. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **6** :190-196, 1993.
- PAN,S.Q.; YE,X.S.; KUC,J. Induction of chitinases in tobacco plants systemically protected against blue mold by *Peronospora tabacina* or tobacco mosaic virus. **Phytopathology**, ST. Paul, **82** : 119-123, 1992.
- PASCHOLATI,S.F. & LEITE,B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ,W.C. (ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994. v. 2, p. 1-52.
- PASCHOLATI,S.F. & LEITE,B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO,A.; KIMATI,H.; AMORIM,L. (ed.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-454.
- PASCHOLATI,S.F. & NICHOLSON,R.L. *Helminthosporium maydis* suppresses expression of resistance to *Helminthosporium carbonum* in corn. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **107** : 97, 1983.

- PASCHOLATI,S.F.; FIGUEIREDO,M.B.; MORAES,W.B.C. Efeito da temperatura e idade da cultura na germinação, crescimento micelial e esporulação de *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, **8** :109-116, 1983.
- PASCHOLATI,S.F.; HEIM,D.; NICHOLSON,R.L. Phenylalanine ammonia-lyase and susceptibility of maize mesocotyl to *Helminthosporium maydis*. **Physiological Plant Pathology**, London, **27** : 345-356, 1985.
- PASCHOLATI,S.F.; NICHOLSON,R.L.; BUTLER,L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **115** : 165-172, 1986.
- PATERNIANI,E. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**.Piracicaba, Marprint, 1980. 650 p.
- PATYKOWSKI,J.; URBANEK,H.; KACZOROWSKA,T. Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *Erysiphe graminis* DC. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **122** : 126-134, 1988.
- 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**, St. Paul, **70**: 376-7, 1986.
- PELTONEN,S. & KARJALAINEN,R. Phenylalanine ammonia-lyase activity in barley after infection with *Bipolaris sorokiniana* or treatment with its purified xylanase. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **143** : 239-245, 1995.
- PONSTEIN,A.S.; VLOEMANS,S.A.B.; BUURLAGE,M.B.S.; ELZEN,P.J.M.; MELCHERS,L.S.; CORNELISSEN,B.J.C. A novel pathogen - and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, Lancaster, **104** : 109-118, 1994.
- PUROSHOTHAMAN,D. Phenylalanine ammonia-lyase and aromatic amino-acids in rice varieties infected with *Xanthomonas oryzae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **80** : 171-175, 1974.
- RAHE,J.E.; KUC,J.; CHUANG,C.M.; WILLIAMS,E.B. Correlation of phenolic metabolism with histological changes in *Phaseolus vulgaris* inoculated with fungi. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, **75** : 58-71, 1969.
- REDOLFI,P.; CANTISANI,A.; MIGHELI,Q. The pathogenesis-related proteins of *Phaseolus* bean. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **126** : 193-203, 1989.

- REIMMANN,C.R.; RINGLI,C.; DUDLER,R. Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. **Plant Physiology**, Lancaster, **100**(1) : 1611-1612, 1992.
- REUVENI,R. & BOTHMA,G.C. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaerotheca fugilinea* in melons. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **114** : 260-267, 1985.
- REUVENI,R. & FERREIRA,J.F. The relationship between peroxidase activity and the resistance of tomatoes (*Lycopersicum esculentum*) to *Verticillium dahliae*. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **112** : 193-197, 1985.
- REUVENI,R.; SHIMONI,M.; CRUTE,I.R. An association between high peroxidase activity in lettuce (*Lactuca sativa*) and field resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, **132** : 312-318, 1991.
- RIBÉREAU-GAYON,P. **Plant Phenolics**. In: RIBÉREAU-GAYON,P (ed.). Edinburgh. T. & A. Constable Ltda. 1972. 247 p.
- RIDE,J.P. The role of cell wall interactions in resistance to fungi. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, **89** : 302-306, 1978.
- RIDE,J.P. Cell walls and other structural barriers in defence. In: CALLOW,J.A. (ed.). **Biochemical plant pathology**. Chichester, John Wiley & Sons. 1983. p. 215-236.
- ROGGERO,P. & PENNAZIO,S. The extracellular acidic and basic pathogenesis-related proteins of soybean induced by viral infection. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **127** : 274-280, 1989.
- ROSS,A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. **Virology**, **14** : 340-358, 1961.
- SALISBURY,F.B. & ROSS,C.W. Lipids and aromatic compounds. In: **Plant Physiology**, 2a. ed., California, Wadsworth Publishing Company, 1978. p. 422.
- SALMANOWICZ,B. & NYLUND,J.E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in Scots pine. **European Journal Forest Pathology**, **18** : 291-298, 1988.

- ✓ SALUNKHE, D.K. & SHARMA, R.P. Introduction to phytoalexins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and Phytoalexins**. Boca Raton - Florida, CRC Press, 1991. Cap. 19.
- SANCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. **Plant Physiology**, Lancaster, **91** : 1481-1487, 1989.
- SAUNDERS, B.C.; HOLMES-SIEDLE, A.G.; STARK, B.P. **Peroxidases. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts**. Washington, Butter Worths, 1964. 264 p.
- SCHRAUDNER, M.; ERNEST, D.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN, H. Biochemical plant responses to ozone. III. Activation of the defense-related proteins β -1,3 glucanase and chitinase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, **99** : 1321-1328, 1992.
- SEITZ, L.M.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D.B. Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemists**, St. Paul, **54**(6) : 1207-1217, nov/dez 1977.
- SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H.E.; HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, St. Paul, **69** : 1202-1203, 1979.
- SHERWOOD, R.T. & VANCE, C.P. Resistance to fungal penetration in graminea. **Phytopathology**, St Paul, **70**(4) : 273-279, 1980.
- SHIMONI, M.; BAR-ZUR, A.; REUVENI, R. The association of peroxidase activity and resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **131** : 315-321, 1991.
- SHIMONI, M.; BARZUR, A.; REUVENI, R. The relation between isozymes of β -1,3 glucanase and resistance of near-isogenic maize inbred lines to *Exserohilum turcicum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, **4** : 285-288, 1992.
- SHIRAISHI, T.; YAMADA, T.; NICHOLSON, R.L.; KUNOH, H. Phenylalanine ammonia-lyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (race 1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, **46** : 153-162, 1995.

SHURTLEEF, M.C. **Compendium of corn diseases**. 2a. ed. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1980.

SMITH, D.A.; VANETTEN, H.D.; BATEMAN, D.F. Accumulation of phytoalexins in *Phaseolus vulgaris* hypocotyls following infection by *Rhizoctonia solani*. **Physiological Plant Pathology**, London, **5** : 51-64, 1975.

SOUTHERTON, S.G. & DEVERALL, B.J. Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. **Plant Pathology**, Oxford, **39** : 223-230, 1990.

SRIVASTAVA, S.K. Peroxidase and poly-phenol oxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Macrophomina phaseolina* (Tassai) Goid. and their implication in disease resistance. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **120**: 249-254, 1987.

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

STANGARLIN, J.R.; PICCININ, E.; DA GLÓRIA, B.A.; OSSWALD, W.; PASCHOLATI, S.F. Aspectos histológicos e bioquímicos da interação *Exserohilum turcicum* e tecido foliar de sorgo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXVII, Itajaí, 1994. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 1994. 19, p. 278.

STINTIZI, A.; HEITZ, T. PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S. GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, **75** : 687-706, 1993.

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**, Berlin, **107** : 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**, St. Paul, **73**: 151-5, 1989.

TRESE, A. & LOSCHKE, D.C. High contrast resolution of the mycelia of pathogenic fungi in corn tissue after staining with calcofluor and destaining with cellulase. **Phytopathology**, St. Paul, **80**: 196-200, 1990.

- TUZUN,S.; RAO,M.N.; VOGELI,U.; SCHARDL,C.L.; KUC,J. Induced systemic resistance to blue mold: early induction and accumulation of β -1,3 glucanases, chitinases, and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. **Phytopathology**, St. Paul, **79** : 979-983, 1989.
- ULLSTRUP,A.J. **Leaf blight of corn**. Lafayette: Purdue University, Agricultural Experiment Stations, 1952. (Station Bulletin, 572).
- VAD,K.; MIKKELESSEN,J.D.; COLLINGE,D.B. Induction, purification and characterization of chitinase isolated from pea leaves inoculated with *Ascochyta pisi*. **Planta**, **184** : 24-29, 1991.
- Van LOON,L.C.; Van KAMMEN,A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**, **40**, 199-211, 1970.
- VANCE,C.P.; ANDERSON,J.D.; SHERWOOD,RR.T. Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. **Plant Physiology**, Lancaster, **57**(6) : 920-922, 1976.
- VANCE,C.P.; KIRK,T.K.; SHERWOOD,R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, **18** : 259-288, 1980.
- VANDAMME,E.J.M.; WILLEMS,P.; TORREKENS,S.; VAN LEUVEN,F.; PEUMANS,W.J. Garlic (*Allium sativum*) chitinases: characterization and molecular cloning. **Physiology Plantarum**, **87** : 177-186, 1993.
- VEGETTI,T.H.; CONTI,G.G.; PESCE,P. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase during the development of local necrotic lesions in pinto bean leaves infected with alfafa mosaic virus. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, **84** : 153-171, 1975.
- VIDHYSEKARAN,P. **Physiology of disease resistance in plants**. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1988. 149 p.
- VIGERS,A.J.; ROBERTS,W.K.; SELITRENNIKOFF,C.P. A new family of plant antifungal proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**(4) : 315-323, 1991.

- VITTI,A.J. Epidemiologia comparativa entre a ferrugem comum (*Puccinia sorghi* Schweinitz) e a helmintosporiose (*Exserohilum turcicum* (Passerini) Leonard & Suggs) do milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1993. 102 p. (Mestrado - ESALQ/USP).
- VITTI,A.J.; BERGAMIN FILHO,A.; AMORIM,L.; FEGIES,N.C. Epidemiologia comparativa entre a ferrugem comum e a helmintosporiose do milho: I. Efeito de variáveis climáticas sobre os parâmetros monocíclicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, **21**(2): 127-130, 1995.
- WAGIH,E.E. Stress proteins and isozymology of acid phosphatase, esterase, and peroxidase in *Phaseolus vulgaris* following peanut mottle virus infection. **Journal of Phytopathology**, Berlin, **139** : 157-164, 1993.
- WIRTH & WOLF. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods** **12**:197-205, 1990.
- YALPANI,N.; SHULAEV,V.; RASKIN,I. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. **Phytopathology**, St Paul, **83** : 702-708, 1993.
- YE,X.S.; PAN,S.Q.; KUC,J. Activity, isozyme pattern, and cellular localization of peroxidase as related to systemic resistance of tobacco to blue mold (*Peronospora tabacina*) and to tobacco mosaic virus. **Phytopathology**, St Paul, **80**(12) : 1295-1299, 1990.
- ZADOKS,J.C. Systems analysis and the dynamics of epidemics. **Phytopathology**, St. Paul, **61**: 600-10, 1971.

APÊNDICE

Figura 1. Representação esquemática da microcâmara-de-inoculação (adaptado de BERGSTROM & NICHOLSON, 1983).

Figura 2. Regiões da folha de milho amostradas 12 dias após a inoculação com *E. turcicum* (1×10^4 esporos/ml). **LE:** lesão necrótica; **HA:** tecido verde com 2,0 mm de largura adjacente à lesão necrótica; **TV:** tecido verde distante da lesão necrótica e/ou pontos cloróticos; **PC:** pontos cloróticos; **SA:** tecido sadio de folha não inoculada. Na linhagem resistente ao patógeno foram coletadas somente as amostras SA, TV e PC, enquanto que na suscetível os cinco tipos de regiões foram amostradas.

Figura 3. Germinação (A), formação de apressórios (B) e penetração (C) de conídios de *E. turcicum*, inoculado na concentração de 1×10^4 esporos/ml, em folhas de milho de linhagens resistente (■) e suscetível (□). As barras representam o erro padrão da média.

Figura 4. Cinética de crescimento de lesões causadas por *E. turcicum* (1×10^4 esporos/ml) em folhas de milho de linhagens suscetível (A) e resistente (C). Em (B) e (D) estão representados o nº de lesões (LE; ■) e/ou pontos cloróticos (PC; □) formados/folha 14 dias após a inoculação. As barras representam o erro padrão da média.

Figura 5. Sintomas resultantes da inoculação com *E. turcicum* (1×10^4 esporos/ml) em linhagens de milho suscetível (A) e resistente (B), através de microcâmara-de-inoculação. LN: lesão necrótica; PC: pontos cloróticos; LI: local de inoculação. Barra = 1 cm.

Figura 6. Cortes transversais de folhas de milho suscetível à *E. turcicum*, mostrando a presença de micélio (M) no interior dos vasos do xilema (VX), 12 dias após a inoculação. Fotografias obtidas em microscópio ótico. (A): material colorido com azul de o-toluidina; (B): material sem coloração. Barra = 25 μ m.

Figura 7. Cortes transversais de folhas de milho coletadas 12 dias após a inoculação com *E. turcicum*, mostrando a presença de micélio (M) no interior dos vasos do xilema (VX). (A) e (B): linhagem suscetível (1050 X e 2600 X, respectivamente); (C): linhagem resistente (3300 X); (D): linhagem suscetível não inoculada (775 X). Micrografia eletrônica de varredura.

Figura 8. Curva padrão para o ácido clorogênico (0 a 300 µg/ml).

Figura 9. Conteúdo de compostos fenólicos em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 10. Curva padrão para a determinação da concentração de ácido *trans*-cinâmico.

Figura 11. Atividade de fenilalanina amônia-liase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 12. Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford, utilizando reagente concentrado.

Figura 13. Bioensaio para a caracterização de frações fungitóxicas presentes em folhas de linhagens de milho suscetível e resistente inoculadas com *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml. A área clara ao redor das bandas indica inibição do crescimento fúngico. (A): Cromatografia de camada delgada ("TLC"); (B): Características das frações obtidas por "TLC".

Figura 14. Atividade de peroxidase em folhas de milho de linhagens suscetível (A) e resistente (B) à *E. turcicum*. Amostras coletadas a diferentes intervalos de tempo após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml. Em (C) está representada a atividade enzimática nos tecidos inoculados em relação aos tecidos sadios não inoculados. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 15. Folhas de milho resistente inoculadas com 1×10^4 esporos/ml de *E. turcicum*, exibindo regiões de lignificação. (A): pontos de penetração do patógeno (PP); (B): detalhe de um ponto de penetração mostrando conídio (C) e apressório (A). (C): micélio (M) nos tecidos da planta. Amostras coletadas 24 e 48 h após a inoculação em (A) e (C), respectivamente. Lignificação representada pela coloração azul. Fotografia obtida em microscópio ótico. Barra = 25 μ m.

Figura 16. Atividade de peroxidase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 17. (A): Eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extrato de folhas de milho suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após inoculação com 1×10^4 esporos/ml. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. IG: interseção entre os géis concentrador e de corrida. SA, TV, HA, LE e PC regiões amostradas representadas na Figura 2; M: extrato do micélio do patógeno. (B): Padrão eletroforético representado por densitometria (filtro de 405 nm), onde os números representam as bandas individuais (a: Linhagem resistente; b: Linhagem suscetível).

Figura 18. Curva padrão para determinação de glicose através do método de Lever.

Figura 19. Atividade de β -1,3 glucanase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 20. Influência da concentração do extrato enzimático na determinação da atividade de quitinase *in vitro*. A curva representa a absorbância a 550 nm de solução contendo 200 µl de "CM-Chitin-RBV" e 800 µl de tampão acetato.

Figura 21. Atividade de quitinase em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média.

Figura 22. Curva padrão mostrando a relação entre o peso seco do micélio de *E. turcicum*, cultivado em meio LCH, e a quantidade de ergosterol presente.

Figura 23. Quantidade de micélio de *E. turcicum* presente em folhas de milho de linhagens suscetível e resistente ao patógeno. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno. As regiões amostradas estão representadas na Figura 2. Barras representam o erro padrão da média.

Tabela 1. Sumário dos dados referentes ao acúmulo de compostos fenólicos, atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL), peroxidases, β -1,3 glucanases e quitinases, e a quantidade de micélio presente, conforme ilustrados nas figuras 9, 11, 16, 19, 21 e 23, respectivamente, em folhas inoculadas de materiais de milho resistente e suscetível à *E. turcicum*. Amostras coletadas 12 dias após a inoculação com 1×10^4 esporos/ml do patógeno (conforme figura 2).

Característica estudada	Material Resistente (F352) (sítio de infecção (SI) primário)	Material Suscetível (F64A) (SI primário e secundário)
Comp. fenólicos (Eq. μ g ác. clorogênico/gpf)	+++ ¹	+++ ² ++++ ³
F.A.L. (nmoles ác. <i>t</i> -cinâmico/min/mg proteína)	++++	+++ ² ++++ ³
Peroxidases (U.A./min/mg proteína)	+++ ⁴	++++ ² +++ ³
β -1,3 glucanases (μ g glicose/min/mg proteína)	++++++	+++ ² ++++ ³
Quitinases (U.A./min/mg proteína)	+++++	+++ ² +++ ³
Quant. de micélio (mg micélio/gpf)	+	+++ ² ++++++ ³

¹ Amplitude de valores observados: + e ++: baixo ou restrito; +++ e ++++: médio ou moderado; +++++ e ++++++: alto ou acentuado.

² Sítio primário; ³ Sítio secundário.

⁴ Ocorrência de lignificação no sítio de infecção primário do material resistente.