ATIVIDADE DE PEROXIDASES, QUITINASES, β-1,3-GLUCANASES E ALTERAÇÕES NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PEROXIDASES EM MILHO (*Zea mays*) E SORGO (*Sorghum bicolor*) TRATADOS COM *Saccharomyces cerevisiae*

MARCIA CRISTINA RONCATTO
Bióloga e Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1997

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

Roncatto, Marcia Cristina
Atividade de peroxidases, quitinases β-1,3- glucanases e alterações no perfil eletroforético de peroxidases em milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratados com *Saccharomyces cerevisiae* / Marcia Cristina Roncatto. - - Piracicaba, 1997.
108 p. : il

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1997.
Bibliografia.

1. Enzima 2. Levedura 3. Microbiologia agrícola 4. Milho 5. Resistência induzida 6. Sorgo. I. Título

CDD 633.15
633.174

ATIVIDADE DE PEROXIDASES, QUITINASES, β-1,3-GLUCANASES E ALTERAÇÕES NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PEROXIDASES EM MILHO (*Zea mays*) e SORGO (*Sorghum bicolor*) TRATADOS COM *Saccharomyces cerevisiae.*

MARCIA CRITINA RONCATTO

Aprovada em 28.11.1997

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati	ESALQ/USP
Prof[a]. Dr[a]. Helaine Carrer	CEBTEC-ESALQ/USP
PqC. Dr[a]. Elza Maria Frias Martins	IB - SP

Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI
Orientador

Aos meus pais Claudionor e Lucia,
irmãs Gleice e Rosemeire,
pelo apoio e incentivo em todos os momentos,
ao Sérgio Acre Durrer pela sua presença,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Florentino Pascholati do Departamento de Fitopatologia - ESALQ/USP, pelos ensinamentos, amizade e apoio em todos os momentos.

Aos Profs. Luiz Eduardo Gutierrez, Murilo de Mello, Luiz Gallo, Breno Leite, Helaine Carrer e Elza Maria Frias Martins pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho do Departamento de Microbiologia Agrícola pela amizade e paciência durante o transcorrer do curso.

À José Renato Stangarlin, por ter ensinado e acompanhado todos os procedimentos relativos aos experimentos de campo e laboratório e pela sincera amizade desenvolvida durante todo este período.

À Nelson Wulff pelas sugestões e colaboração prestada na confecção das micrografias, pela amizade, preocupação, paciência e dedicação no decorrer do desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia do Parasitismo, Helio, Fabiana, Robson, Kátia, Everaldo, Thaís e Andresa e aos demais colegas do Departamento de Fitopatologia - ESALQ/USP, pelo auxílio e companheirismo durante a execução deste trabalho.

A todo Corpo Docente e demais funcionários do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP pelo convívio durante os anos de curso.

Agradecimento especial a Sérgio Acre Durrer por todo auxílio e apoio prestados durante a execução deste trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro fornecido.

À DEUS pela força e apoio em todos os momentos difíceis.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS i

RESUMO v

SUMMARY vii

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1 Importância do sorgo 4
2.1.1 Principais patógenos da cultura do sorgo 5
2.2 Importância do milho 5
2.2.1 Principais patógenos da cultura do milho 6
2.3 Controle de doenças de plantas 7
2.3.1 Controle alternativo de doenças de plantas 8
2.3.2 Controle biológico 9
2.3.3 Indução de resistência 14
2.3.3.1 Características da indução de resistência 16
2.3.3.2 Agentes bióticos induzindo resistência 19
2.3.3.2.1 Uso da *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas 20
2.3.3.2.2 Indução de resistência em gramíneas 22
2.3.3.3 Indução de resistência sistêmica 23
2.3.3.3.1 Indução de resistência x hidrolases 26
2.3.3.3.2 Sinalizadores moleculares 27
2.4 Aspectos bioquímicos gerais da defesa 30
2.4.1 Peroxidases 31
2.4.1.1 Características de peroxidases 32
2.4.1.2 Reações catalíticas 33
2.4.1.3 Inibição de peroxidases 33
2.4.1.4 Localização da atividade enzimática 34
2.4.1.5 Detecção de peroxidases 35
2.4.1.6 Papel de peroxidases na patogênese 37
2.4.2 Proteínas relacionadas à patogênese 39
2.4.2.1 Quitinases e β-1,3-glucanases 41

3 MATERIAL E MÉTODOS 44

3.1 Material vegetal utilizado nos ensaios 44

3.1.1 Obtenção das plântulas de milho e sorgo 44
3.1.2 Obtenção de mesocótilos estiolados de milho e sorgo 44
3.2 Preparações das células de levedura 45
3.2.1 Obtenção de células de *S. cerevisiae* 45
3.2.2 Obtenção de filtrados de células de *S. cerevisiae* 45
3.2.3 Perfil espectrofotométrico de filtrados de células de levedura autoclavados e não autoclavados 46
3.3 Obtenção do lavado de placas contendo meio de cultura 46
3.4 Inoculação e obtenção das amostras de tecidos 46
3.5 Determinação da atividade de peroxidases 47
3.5.1 Obtenção da fonte enzimática 47
3.5.2 Atividade de peroxidases 47
3.5.3 Determinação da atividade de peroxidases em *S. cerevisiae* 48
3.6 Caracterização isoenzimática de peroxidases 48
3.7 Determinação das atividades de quitinases e β-1,3-glucanases 49
3.7.1 Obtenção da fonte enzimática 49
3.7.2 Atividades de quitinases e β-1,3-glucanases 49
3.7.3 Determinação da atividade de quitinases e β-1,3-glucanases em *S. cerevisiae* 50
3.8 Determinação do conteúdo total de proteínas 51
3.9 Microscopia eletrônica de varredura 51

4 RESULTADOS 52

4.1 Atividade enzimática em extratos obtidos de tecidos de milho e sorgo tratados com *S. cerevisiae* 52
4.2 Atividade de peroxidases, quitinases e β-1,3-glucanases em extratos obtidos de células de *S. cerevisiae* intactas ou homogeneizadas 54
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida 54
4.3.1 Tecidos de milho 54
4.3.2 Tecidos de sorgo 55
4.4 Perfil espectrofotométrico de filtrados de suspensões de *S. cerevisiae* autoclavadas ou não autolcavadas 55
4.5 Microscopia eletrônica de varredura 55

5 DISCUSSÃO 56

5.1 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de tecidos de milho e sorgo, e atividade de quitinases e β-1,3-glucanases em folhas de milho, tratados com *S. cerevisiae* 57
5.2 Atividade de peroxidases, quitinases e β-1,3-glucanases em preparações de células de *S. cerevisiae.* 59
5.3 Isoperoxidases em tecidos de milho e sorgo tratados com *S. cerevisiae.* 60
5.4 Lavado da placa contendo meio de BDA e comparação entre os métodos de armazenagem 61

5.5 Comentários finais 62
6 CONCLUSÕES 66
ANEXOS 67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

LISTA DE FIGURAS

Página

1 Aspecto das plântulas de milho (A) e sorgo (B) no estádio de 7ª folha verdadeira, mantidas em condições de casa-de-vegetação por 25-30 dias 68

2 Aspecto das plântulas de milho (A) e sorgo (B) exibindo mesocótilos estiolados (setas) após cinco dias no escuro em câmara de crescimento 69

3 Atividade de peroxidases em extratos de mesocótilos de milho (cv. AGX-7393), coletados até 72 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média. A) Preparação comercial de *S. cerevisiae*; B) Levedura cultivada em meio BDA 70

4 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de folhas de milho (cv. AGX-7393), coletados até 72 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média 71

5 Atividade de quitinases em extratos obtidos de folhas de milho (cv. XL510), coletados até 96 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média 72

6 Atividade de β-1,3-glucanases em extratos obtidos de folhas de milho (cv. XL510), coletados até 96 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água

destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média 73

7 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de sorgo (cv. Brandes), coletados até 72 horas após o tratamento com preparações *S. cerevisiae* (mantidas em BDA) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média 74

8 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de folhas de sorgo (cv. Brandes), coletados até 72 horas após o tratamento *com S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média..... 75

9 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de folhas de sorgo (cv. Brandes), coletados 48 horas após o tratamento com *S. cerevisiae* (mantidas em BDA) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média..... 76

10 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de células de *S. cerevisiae* (comercial) intactas ou homogeneizadas. Barras representam o erro padrão da média 77

11 Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas de milho (cv. "South America Mushroom"), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para a visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas 78

12 Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de mesocótilos de milho (cv. "South America Mushroom"), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado; (FSA) filtrado de suspensão autoclavada. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas 79

13 Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas de sorgo (cv. Brandes) obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado; (FSA) filtrado de suspensão autoclavado. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas 80

14 Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de mesocótilos de sorgo (cv. Brandes), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado; (FSA) filtrado de suspensão autoclavado. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas 81

15 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de milho (cv. XL510) e sorgo (cv. Brandes), coletados até 72 horas

após o tratamento com suspensão de *S. cerevisiae* (mantidas em BDA), lavado da placa contendo meio BDA ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam o erro padrão da média 82

16 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de milho (A) (cv. XL510) ou sorgo (B) (cv. Brandes), coletados 48 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Amostras armazenadas em congelador ou mergulhadas previamente em nitrogênio líquido e depois armazenadas em congelador. Barras representam o erro padrão da média 83

17 Perfil de absorção dos filtrados obtidos de *S. cerevisiae* cultivadas em BDA ($1x10^8$ céls/mL) autoclavados (a) ou não autoclavados (b) 84

18 Padrão da deposição das células de *S. cerevisiae* sobre folhas de milho (A) e sorgo (B) em microscopia eletrônica de varredura. Barras representam valor de 10 μm 85

ATIVIDADE DE PEROXIDASES, QUITINASES, β-1,3- GLUCANASES E ALTERAÇÕES NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE PEROXIDASES EM MILHO (*Zea mays*) E SORGO (*Sorghum bicolor*) TRATADOS COM *Saccharomyces cerevisiae*

Autora: Biol. e Farm. Marcia Cristina Roncatto

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se verificar a influência de *Saccharomyces cerevisiae* (produto comercial ou células mantidas em meio de cultura) nas atividades das enzimas peroxidases, quitinases, β-1,3-glucanases e no perfil eletroforético de peroxidases, em tecidos de milho e sorgo.

As preparações de levedura utilizadas foram representadas por suspensões de células e seus respectivos filtrados, autoclavados ou não. A análise dos extratos obtidos dessas gramíneas, submetidos aos diferentes tratamentos com *S. cerevisiae*, mostrou aumentos na atividade da peroxidase, quitinase e β-1,3-glucanase. Porém, tecidos de sorgo exibiram melhor resposta aos tratamentos em comparação aos tecidos de milho, da mesma forma que o tratamento FSA (filtrado de suspensão autoclavada) estimulou uma maior atividade da peroxidase em relação aos outros tratamentos. A atividade de quitinase foi maior em todos os tratamentos nos diversos tempos em relação ao controle, porém a β-1,3-glucanase exibiu maior atividade 48 e 72 horas após os tratamentos.

Suspensões de células e os filtrados dessas suspensões de células, tratadas termicamente ou não, foram efetivos nas alterações enzimáticas, demonstrando serem termoestáveis.

Porém, por outro lado, extratos obtidos de células intactas ou homogeneizadas de *S. cerevisiae* apresentaram baixa ou nenhuma atividade de peroxidases, quitinases ou β-1,3-glucanases, indicando que as alterações no aumento da atividade das enzimas e perfil eletroforético de peroxidases nas plantas, não foram devidas as enzimas existentes nas células da levedura.

Finalmente, os resultados sugerem que as alterações ocorridas na atividade e perfil eletroforético de peroxidases e na atividade de quitinases e β-1,3-glucanases nos tecidos de milho e sorgo, em resposta ao tratamento com *S. cerevisiae*, refletem o "reconhecimento" das células ou metabólitos da levedura por parte das plantas, acarretando uma alteração no metabolismo normal do vegetal.

PEROXIDASES, CHITINASES AND β-1,3- GLUCANASES ACTIVITIES AND CHANGES IN THE ELECTROPHORETIC PATTERN OF PEROXIDASES IN MAIZE (*Zea mays*) AND SORGHUM (*Sorghum bicolor*) AFTER TREATMENT WITH *Saccharomyces cerevisiae*

Author: Biol. e Farm. Marcia Cristina Roncatto
Adviser: Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

SUMMARY

The aim of this work was to verify the influence of *Saccharomyces cerevisiae* (commercial baker's yeast or cultivated yeast cells in solid medium) on peroxidade, chitinase and β-1,3-glucanase activities and changes in the electrophoretic pattern of peroxidase in maize and sorghum tissues.

The yeast treatments included cell suspension and its filtrate, autoclaved or not. These treatments induced an increase in peroxidase, chitinase and β-1,3-glucanase activities in both maize and sorghum. However, sorghum tissues exhibited better responses to treatments than maize tissues, the same results was found in the treatment with autoclaved cell filtrate, which stimulated high peroxidase activity compared to other treatments. The chitinase activity was higher in all treatments during all the time in relation to the control, while β-1,3-glucanase exhibited higher activity only at 48 and 72 hours after the treatment.

Cell suspension and its filtrate, autoclaved or not, were effective in altering the activities of the enzymes showing to be thermostable.

By other hand, extracts from intact or homogenized *S. cerevisiae* cells showed low or no activity of peroxidases, chitinases or β-1,3-glucanases, indicating that the changes in the activities or electrophoretic pattern of peroxidases on plants were not due to the enzymes present in the yeast cells.

Finally, the results suggest that the changes in peroxidases activity and electrophoretic pattern and chitinases and β-1,3-glucanases activities in maize and sorghum tissues in response to treatment with *S. cerevisiae*, indicate the possible recognition of the yeast cells or their metabolites by the plants.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados no mundo, e sua importância não se restringe ao fato de ser produzido em grande volume e sobre imensa área cultivada, mas também pelos seus diversos usos como matéria-prima básica para uma série de produtos industrializados, e também pelo fato de milhares de pessoas encontrarem nele o seu sustento.

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] constitui um vasto grupo de plantas que oferecem amplas possibilidades de utilização tanto nas propriedades agrícolas como para fins industriais. O plantio do sorgo é considerado uma nova fonte de riqueza, pois como o milho, o sorgo pode ser transformado em amido, dextrose, óleos comestíveis e ainda servir de alimentação na forma de silagem e ração para animais.

No Brasil, apesar de toda tecnologia disponível, tanto o milho quanto o sorgo estão sujeitos ao ataque de vários patógenos, resultando em baixos índices na produtividade. Com uma perda acentuada na produção, o problema tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores visando o desenvolvimento de formas mais racionais para o controle das doenças de milho e sorgo.

O controle químico pode ser utilizado, o qual apesar de ser um dos mais eficientes e garantir alta produtividade, tem levado a uma série de conseqüências ambientais indesejáveis. O uso indiscriminado tem ocasionado o aparecimento de raças de patógenos resistentes comprometendo a saúde da população e de animais silvestres em função da toxidez.

A indução de resistência e o controle biológico são métodos alternativos de controle de doenças de plantas, com o potencial de minimizar os problemas acima descritos (Bettiol, 1991). A ativação dos mecanismos de resistência nas plantas, pode

constituir em método prático para o controle das doenças vegetais (Kuć, 1977; Sequeira, 1983). Atualmente a indução de resistência representa uma nova estratégia no controle de doenças, onde ocorre a ativação dos mecanismos de resistência latentes nas plantas, tanto bioquímicos como estruturais, de forma dinâmica e coordenada.

A defesa ativa das plantas contra fitopatógenos pode envolver alterações metabólicas na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário (Fric, 1976). A enzima peroxidase, a qual está presente nos tecidos das plantas, é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de grande importância, incluindo a oxidação de compostos fenólicos e a biossíntese do hormônio vegetal etileno (Misaghi, 1982) e de lignina (Abeles & Biles, 1991). Aumentos na atividade desta enzima durante o desenvolvimento das doenças na plantas, tem sido correlacionados como a expressão de resistência em diferentes sistemas patógeno-hospedeiro (Hammerschmidt et al.,1982; Ye et al., 1990).

Várias proteínas relatadas à patogênese tem sido identificadas em resposta a inoculação com fitopatógenos de tecido vegetais, como as quitinases e as β-1,3-glucanases (Kauffmann et al., 1987; Legrand et al., 1987). Estas hidrolases ocorrem normalmente em plantas (flores, folhas, raízes) e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, uma vez que a quitina (formada por polímeros de N-acetilglicosamina) e as β-1,3-glucanas, mostram-se como os principais constituintes da parede celular fúngica (Pascholati & Leite, 1995).

Essas respostas de defesa podem ser induzidas por elicitores bióticos (extratos de microrganismos ou de plantas), assim como, por elicitores abióticos (compostos orgânicos e inorgânicos) (Lyon et al., 1995). Diante do exposto, procurando contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência constitutivos e induzíveis, em plantas de milho e sorgo, bem como os mecanismos de ação da levedura *S. cerevisiae* no fenômeno da proteção de plantas contra fitopatógenos, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de:

a) demonstrar o potencial das preparações de *S. cerevisiae* em modificar a atividade da enzima peroxidase em folhas e mesocótilos de milho e sorgo e a atividade de quitinase e β-1,3-glucanase em folhas de milho;

b) analisar os perfis isoenzimáticos da peroxidase em tecidos de milho e sorgo, em resposta ao tratamento com preparações de *S. cerevisiae.*

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância do sorgo

O sorgo é um das culturas mais importantes do terceiro mundo, particularmente em regiões onde a deficiência hídrica ou a distribuição irregular de chuvas constituem fatores limitantes ao cultivo de outros cereais. Assim o sorgo distingue-se dentre os cereais pela faixa de condições ambientais em que é cultivado com relativa vantagem em muitas áreas exibindo problemas de deficiência hídrica (Veiga, 1986). Além disso, a carência de alimentos em certas partes do mundo coloca o sorgo como a principal alternativa para as populações do leste e sul da África, África central e ocidental, estendendo-se também a muitas outras regiões asiáticas e americanas (Paul, 1990).

O grão do sorgo é essencialmente utilizado na formulação de ração para as aves, suínos e bovinos. Em muitas regiões da África e da Ásia, o grão constitui alimento básico humano, servindo também como matéria prima para a indústria de panificação e de bebidas alcoólicas (House, 1985; Paul, 1990).

No Brasil, o sorgo é utilizado, em quase sua totalidade, na alimentação animal como feno e silagem e ainda como substituto parcial do milho na composição de rações balanceadas. As informações hoje existentes indicam que a farinha de sorgo pode ser utilizada na fabricação de pão (até 15%) e na fabricação de biscoitos, bolos e massas (até 50%). A produção do sorgo concentra-se nas regiões sul e sudeste, responsáveis por cerca de 78% do total nacional (Pitta, 1991). Segundo Fancelli (1986), o sorgo ainda pode ser utilizado para a confecção de vassouras e produção de forragens tanto para pasto como para a conservação de feno ou silagem.

O Brasil possui extensas regiões aptas ao cultivo do sorgo (Viana et al., 1986), mas só recentemente a cultura tem apresentado potencial para a sua exploração econômica. Pela ampla faixa de condições em que é cultivado (cultura totalmente mecanizada, do plantio à colheita; grande amplitude de épocas de plantio; melhor utilização de áreas, principalmente aquelas com deficiência hídrica; apresenta-se particularmente suscetível a um grande número de doenças, cuja severidade varia em função do grau de compatibilidade entre o hospedeiro e o patógeno e da ação do ambiente sobre esta associação (Frederiksen, 1986; Ferreira et al., 1986).

2.1.1 Principais patógenos da cultura do sorgo

O sorgo é infectado por fungos, bactéria, vírus e nematóides. Dentre esses patógenos, os fungos são considerados os mais importantes, em razão do grande número de doenças e dos prejuízos que causam. Como por exemplo, podemos citar a antracnose causada por *Colletotrichum graminicola*, a ferrugem por *Puccinia purpurea*, o míldio por *Peronosclerospora sorghi*, a helmintosporiose por *Exserohilum turcicum*, a doença açucarada do sorgo causada por *Claviceps africana* e a podridão seca do colmo causada por *Macrophomina phaseolina* (Pannizi & Fernandes, 1997). Além disso, grande parte deste patógenos tem na semente seu principal veículo de disseminação podendo causar perdas de até 12% na produção mundial, bem como na qualidade das sementes (Agarwal & Sinclair, 1987). Algumas bactérias, vírus e nematóides, embora em menor freqüência, também prejudicam a qualidade das sementes, além de torná-las importantes agentes de transmissão de doenças em sorgo (Frederiksen, 1986) .

2.2 Importância do milho

Das espécies cultivadas pelo homem, o milho, apresenta-se como o mais cosmopolita, sendo amplamente cultivado no mundo (Osuma & Moro, 1995). O milho somente é conhecido em cultivo e, na sua forma atual, não apresentando indicativos de que poderia subsistir sem os cuidados do homem. Os pesquisadores tem desenvolvido

tipos bastante diferentes de milho, tornando seu cultivo possível desde o Equador até o limite de terras temperadas, bem como do nível do mar até altitudes superiores a 3.600 m. Essa adaptabilidade, representada por genótipos variados, reflete na sua variada utilização como alimento, forragem ou na indústria.

A cultura do milho é igualmente importante no Brasil, devido à multiplicidade de usos na propriedade rural quanto à tradição de cultivo desse cereal pelos agricultores brasileiros (Magalhães et al, 1995).

O milho sempre foi considerado uma planta rústica, capaz de suportar bem vários tipos de estresse ambiental. Hoje, no entando com a expansão das fronteiras agrícolas, com a prática da monocultura e com a ampliação das épocas de cultivo, esta realidade mudou. Surgiram novos problemas para a cultura, principalmente em relação às doenças, capazes de afetar seriamente o desempenho econômico das lavouras (Pereira, 1997).

2.2.1 Principais patógenos da cultura do milho

A cultura do milho é alvo de doenças causadas principalmente por fungos, sendo as perdas causadas por estas moléstias ainda não foram totalmente determinadas no Brasil. Porém, é inegável o potencial de prejuízo que podem causar a cultura, não somente na produção, mas também na qualidade, na palatabilidade e no valor nutritivo dos grãos (Luz, 1995).

Segundo Cruz et al. (1995), a medida que o nível tecnológico e a extensão territorial de uma cultura aumentam, ou seja quando sua exploração é intensiva e em sistema de monocultura, normalmente tem-se um aumento no desequilíbrio da entomofauna. O uso de produtos químicos de maneira abusiva e inadequada, em vez de controlar eficientemente uma determinada praga, pode ocasionar resíduos nos produtos e na eliminação de inimigos naturais. Portanto, embora sejam importantes para uso na cultura do milho, esses produtos devem possuir propriedades que evitem os problemas mencionados, ou os causem em menor escala.

Dentre os principais patógenos que atacam a cultura do milho atualmente no Brasil, podemos citar: os fungos - *Puccinia sorghi* causadora da ferrugem comum, *Exserohilum turcicum* causador da mancha foliar, *Peronosclerospora sorghi* causador da mancha marrom, *Ustilago maydis* causador do carvão cumum, *Fusarium spp* causador de podridão de colmo, *Colletotrichum graminicola* causador da antracnose, *Pythium spp* causador de podridão do colmo; as bactérias - *Pseudomonas avenae* e *Erwinia chrysanthemi* causadoras de mancha bacteriana da folha e podridão bacteriana do colmo, respectivamente; os vírus - *Potyvirus* causador do mosaico comum, *Marafivirus* causador da risca do milho, gênero *Nucleorhabidovirus* causador da faixa clorótica das nervuras, e finalmente os fitoplasmas - causando enfezamento vermelho e enfezamento pálido (Pereira, 1997).

2.3 Controle de doenças de plantas

O controle de doenças de plantas é o mais importante objetivo prático da Fitopatologia. Sem controle, doenças de plantas podem ocasionar enormes prejuízos, de conseqüências sociais muitas vezes catastróficas, envolvendo a morte de milhares de pessoas. Contam-nos os historiadores que, aproximadamente dois séculos após sua introdução, a batata (*Solanum tuberosum*) tornou-se a base da alimentação dos habitantes do norte da Europa Ocidental, devido ao grande valor nutritivo e além disto poucos problemas fitossanitários ocorriam na lavoura. Por volta de junho de 1845, uma terrível doença (hoje conhecida por requeima, causada pelo fungo *Phythophthora infestans*) começou a se disseminar em muitos países da Europa Ocidental. Na Irlanda, o fungo destruiu 80% das plantações, levando à morte dois milhões de pessoas e um milhão de emigrantes, passando sua população de 8,3 milhões para 5,2 milhões de habitantes, 30 anos depois (Bergamin Filho & Kimati, 1995).

Não tão dramático, mas ainda de forma alarmante, doenças de plantas continuam cobrando pesado tributo do homem, na forma de prejuízos na exploração agrícola de numerosas espécies vegetais de interesse econômico. Estima-se que mais de

30% da produção agrícola mundial são perdidos anualmente por problemas fitossanitários (Kimati & Bergamin Filho,1995).

O controle de doença de plantas foi definido por Whetzel et al. (1925) como "prevenção dos prejuízos de uma doença". Fawcetti & Lee (1926) afirmaram que "na prevenção e no tratamento de doenças deve-se sempre considerar a eficiência dos métodos e o custo dos tratamentos, sendo óbvia a procura por métodos de baixo custo. Por sua vez, Whetzel et al. (1925) e Whetzel (1929) agruparam os métodos de controle em quatro princípios biológicos gerais:

- **exclusão** - prevenção da entrada de um patógeno numa área ainda não infestada;
- **erradicação** - eliminação do patógeno de uma área em que foi introduzido;
- **proteção** - interposição de uma barreira protetora entre as partes suscetíveis da planta e o inóculo do patógeno, antes de ocorrer a deposição;
- **imunização** – desenvolvimento de uma população de plantas imunes ou altamente resistentes, em uma área infestada com o patógeno.

Com o tempo a esses princípios foram acrescentados: o da **terapia**, que visa restabelecer a sanidade de uma planta com o qual o patógeno já estabeleceu uma íntima relação parasítica; **regulação** onde as medidas de controle são baseadas em modificações do ambiente e **evasão** onde ocorre prevenção da doença pelo plantio em épocas ou áreas quando ou onde o inóculo é ineficiente, raro ou ausente (Kimati & Bergamin Filho, 1995).

2.3.1 Controle alternativo de doenças de plantas

Nas últimas décadas, a obsessão do homem pela otimização de suas culturas, tanto quanto à qualidade como quanto à produtividade, o levou a desenvolver agentes químicos cada vez mais potentes no combate à pragas e doenças de plantas. A prática do uso de fungicidas, inseticidas, herbicidas e outros tipos de defensivos tornou-se por vezes, abusiva e indiscriminada, o que levou pesquisadores, fitopatologistas, biólogos, ambientalistas e ecologistas dos países industrializados a se preocuparem com os riscos potenciais que o controle químico pode acarretar no ambiente, à fauna e à flora, e ao próprio homem. Daí a razão principal para que volumosas somas de recursos venham

sendo alocadas para programas de pesquisa, que visem métodos alternativos de controle de doenças e pragas (Moraes, 1991).

Quanto a prática do tratamento químico, podemos citar o controle da mancha foliar em plantas de milho, causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Pereira, 1997) e o controle da ferrugem do cafeeiro causada por *Hemileia vastatrix* (Godoy et al., 1997).

A utilização de fungicidas no controle de doenças de plantas exibe algumas desvantagens, como: **a)** requer equipamentos específicos além de mão-de-obra, fatos que associados ao custo dos produtos, eleva muito as despesas de custeio da cultura; **b)** comprometimento ambiental que advém do uso e abuso dos produtos químicos; **c)** efeitos nocivos ao homem devido ao modo incorreto de utilização; **d)** alto custo; **e)** aumento da resistência dos fitopatógenos. Conforme descrito, todas estas desvantagens tem levado os pesquisadores de todo o mundo a intensificarem pesquisas na área de controle alternativo, visando desenvolver processos mais naturais e menos comprometedores no controle de doenças vegetais (Roveratti, 1989).

Com o avanço da fitopatologia novos métodos de controle e manejo cultural estão sendo desenvolvidos e aperfeiçoados. Atualmente, a necessidade de mercado exige que os produtos além de boa aparência e qualidade, não apresentem riscos à saúde humana, ou seja, cada vez mais os consumidores e os países importadores de produtos agrícolas apresentam maior rigor na obtenção de produtos que apresentem baixos resíduos de defensivos agrícolas. Assim sendo, existe a necessidade de criarmos condições de praticar uma agricultura com baixo impacto ambiental, ou mesmo visando a nossa permanência como país exportador de produtos agrícolas (Piccinin, 1995).

Dentre os métodos alternativos de controle de doenças estão o controle biológico e a indução de resistência.

2.3.2 Controle biológico

Os métodos físicos e biológicos de controle de doenças são pouco utilizados e eram, até recentemente pouco estudados. Entretanto, devido às pressões econômicas e

ecológicas, as instituições executoras e financiadoras de pesquisa elegeram o desenvolvimento de alternativas ao controle químico exclusivo, como prioritárias em proteção de plantas. Dentro destas alternativas o controle biológico é que vem sentindo os maiores avanços (Bettiol,1991).

Durante a evolução, as plantas suscetíveis foram destruídas pela competição, doenças e pragas. As plantas sobreviventes permaneceram em equilíbrio com patógenos e insetos que as atacavam e freqüentemente produziam substâncias inseticidas e fungicidas para se defenderem. Microorganismos como fungos, bactérias e leveduras foram também selecionados juntamente no processo evolutivo, e vivem atualmente em associação com as plantas trazendo muitos benefícios, como a síntese de vitaminas, hormônios, aminoácidos, fixação de nitrogênio, produção de substâncias tóxicas aos patógenos impedindo ou dificultando o ataque de microorganismos (Tokeshi,1992).

Devido a importância dos microrganismos no controle de doenças e pragas é que o uso de defensivos agrícolas tem preocupado os pesquisadores pois, quando estes são aplicados preventivamente, destroem toda a microflora benéfica, resultando em desequilíbrio biológico, facilitando assim o desenvolvimento dos patógenos. Visando o estabelecimento destas relações hospedeiro e microflora benéficas, surgiram estudos procurando encontrar microrganismos antagônicos para os mais variados patógenos, para o controle de doenças, dando origem ao controle biológico de doenças de plantas.

Dentro do contexto de controle biológico, a doença é o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro (Cook & Baker, 1983; Cook, 1985). Portanto, patógeno, hospedeiro e antagonistas, interagindo num sistema biológico, são os componentes do controle biológico.

A maneira tradicional de se definir controle biológico de doenças de plantas é considerá-lo como o controle de um microrganismo através de outro microrganismo (Bettiol, 1991). O controle biológico tem atraído grande interesse porque aumenta a regulação e a restrição do uso de pesticidas. O excessivo uso de produtos de largo

espectro ou produtos químicos persistentes pode resultar na contaminação do solo, na resistência à fungicidas ou outros efeitos prejudiciais.

Garret (1965) definiu controle biológico como "alguma condição sob a qual, ou por meio da qual, a sobrevivência ou atividade de um patógeno é reduzida completamente em função da atividade de algum outro organismo, exceto o próprio homem.

O controle biológico está baseado na atividade antagônica ou predadora de um organismo sobre o outro. Este antagonismo pode ser direto ou indireto caso se trate de uma ação direta sobre o patógeno ou de uma ação que determine condições desfavoráveis ao desenvolvimento do patógeno, respectivamente.

Para os fitopatologistas, antagonistas são agentes biológicos com o potencial de interferir negativamente no processo de vida de patógenos de plantas e incluem principalmente microrganismos como fungos, bactérias e vírus, porém outros organismos como nematóides podem ser considerados (Roveratti, 1989). Entre microrganismos, considera-se que existem três tipos de antagonismo: antibiose, competição e parasitismo (Baker & Cook, 1976; Blakeman & Fokkema, 1982; Cook & Baker, 1983). Porém, um mesmo antagonista pode utilizar mais de uma forma de antagonismo relacionando sua ação com mais de um mecanismo.

Antibiose é definida como uma interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro. Usualmente, ocorre inibição no crescimento e/ou na germinação, podendo ser letal, mas o metabólito pode penetrar na célula e inibir sua atividade por toxicidade química. Por exemplo, várias espécies de *Pseudomonas*, especialmente fluorescentes, tem sido associadas com a inibição de vários patógenos de solo. Outro exemplo seriam as bactérias do tipo *Agrobacterium radiobacter* var. *radiobacter* que produzem o Agrocin (bacteriocinas), isto é, substâncias antibióticas.

Muitos organismos, especialmente fungos de solo e actinomicetos, produzem substâncias antibióticas, como exemplo o *Trichoderma viridis* (Malloy, 1993). Por sua vez, diversas espécies de *Bacillus*, entre eles o *Bacillus subtilis* (Sanhueza, 1987), também produzem uma enorme gama de antibióticos (Piccinin, 1995).

Leinhos & Buchenauer (1992) demonstraram que o fungo *Verticillium chlamydosporium* produz vários compostos antifúngicos e/ou fitotóxicos, os quais foram usados no sistema aveia-*Puccinia coronata*. Os compostos foram também testados contra *Puccinia recondita* em trigo e *Puccinia sorghi* em plântulas de milho. A produção do composto ativo foi dependente do meio de cultura utilizado (ME- extrato de malte ou PC- "pepetone-Czapek") e o tempo de agitação. O filtrado do meio de cultura ME interferiu no desenvolvimento de várias estruturas do fungo, bem como com o crescimento do tubo germinativo, formação do apressório e haustório. Por sua vez, o filtrado de células do meio de cultura PC mostrou-se altamente fitotóxico, porém foi efetivo na redução da incidência da doença.

Michereff et al. (1993) demonstraram em estudos laboratoriais que diferentes espécies de *Trichoderma* produziram metabólitos extracelulares não voláteis, termoestáveis, difusíveis, que inibiram o crescimento de *Colletotrichum graminicola*, destacando-se o *T. pseudokoningii*, como o mais efetivo.

Um fenômeno a muito tempo conhecido na literatura é o efeito esporostático, observado em várias culturas de fungos inclusive *C. graminicola*, causado pela contínua produção de compostos voláteis ou pela produção de inibidores difusíveis a partir de culturas em crescimento (Dobbs & Hinson, 1953; Robinson & Park, 1966; Leite, 1993). Análise em cromatografia gasosa e de espectrometria de massa, revelou a presença de ácido acético como o principal componente na fração inibidor volátil, em culturas de *C. graminicola* com atividade inibidora (Leite, 1993).

Larena & Melgarejo (1996) relataram que enzimas líticas (β-1,3 glucanases e quitinases), produzidas pelo fungo *Penicillium purpurogenum*, foram potentes agentes de biocontrole contra os fungos patogênicos *Monilinia laxa* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, agentes causadores da seca do ramo em pêssego e murcha do tomateiro, respectivamente.

Competição seria o esforço de dois (ou mais) microrganismos para adquirir a quantidade necessária de um suprimento a partir de um substrato onde este suprimento não é suficiente para ambos. A competição entre microrganismos é principalmente por nutrientes (carboidratos, nitrogênio e fatores de crescimento), espaço (sítios de infecção) e

oxigênio. Leveduras são conhecidas pela capacidade de competir por nutrientes (Bettiol, 1991; Roveratti, 1989).

Maloy (1993) cita um exemplo sobre competição, como no caso do fungo *Heterobasidion annosum,* o qual coloniza troncos de plantas de *Pinus sp* cortados recentemente, causando podridão de raiz. Aspergindo-se suspensões de esporos de *Peniophora gigantea* em troncos cortados antes da infecção com *H. annosum*, este não colonizou o tecido devido a competição pelo espaço ou sítio de infecção.

Elad & Chet (1987) observaram que, dentre 130 bactérias isoladas da rizosfera de plantas infectadas com *Pythium* sp, seis mostravam-se eficientes como agentes de controle biológico deste patógeno em condições de casa-de-vegetação, tendo sido obtida uma redução da doença que variou de 60 a 90%, dependendo da planta hospedeira. Os autores observaram ainda uma correlação na diminuição da doença, com um decréscimo na germinação dos oósporos do patógeno, determinado provavelmente pela competição por nutriente entre as bactérias e os oósporos em germinação.

Parasitismo é um termo usado para designar uma relação nutricional, entre dois seres vivos em que um dos componentes, o parasita, obtêm todo ou parte de seu alimento a partir e às custas do outro componente, o hospedeiro. Hiperparasitas são organismos que parasitam outros parasitas. Eles atacam hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, reduzindo a infecção. *Darluca filum* (*Sphaerellopsis filum*) foi descrito como um parasita de alguns fungos causadores de ferrugem especialmente, *Puccinia* sp e *Uromyces* sp, enquanto que *Cicinobolus* sp foi descrito como parasita de míldio pulverulento. *Trichoderma viride* foi observado parasitando hifas de *Rhizoctonia solani*, assim como outras espécies de *Trichoderma* foram observadas parasitando *Rhizoctonia bataticola* e *Armillaria melea*. Outros fungos são descritos como invasores e colonizadores, e presumidamente parasitas de fungos patogênicos, dentre os quais temos: *Coniothyrium minitans*, *Sporodemium sclerotivorum*, *Gliocladium roseum* e uma espécie de *Corticium* (Maloy, 1993). Verhaar et al. (1996) demonstraram que micoparasitas podem ser usados no controle biológico do míldio pulverulento de pepino, causado por *Sphaerotheca fuliginea*, em casa-de-vegetação, aplicando-se *Verticillium lecanii* e *Sporothrix rugulosa*.

Atualmente, muitos trabalhos tem sido publicados à respeito do controle biológico de doenças pós-colheita em frutos e vegetais, sendo que estes estudos embora estejam ainda à nível experimental, são considerados extremamente promissores. A possibilidade de se empregar bactérias antagonistas para o controle de doenças pós-colheita, foi estudada por Mari et al. (1996), onde avaliou-se a eficácia de bactérias não produtoras de antibióticos contra o agente causal do mofo cinzento em pêra, o fungo *Botrytis cinerea*. Os autores verificaram que essas bactérias possuíam atividade antifúngica devido, provavelmente, mais por competição por nutrientes do que a produção de antibióticos.

O mecanismo de ação dos antagonistas contra patógenos causadores de doenças pós-colheita, como competição por nutrientes essenciais (carboidratos, aminoácidos, oxigênio etc) ou por espaço, mostram-se como um importante aspecto, pois segundo Droby et al. (1991) um aspecto desejável dos agentes de biocontrole de doenças pós-colheita é a ausência de antibióticos.

2.3.3 Indução de resistência

A resistência induzida em plantas, também conhecida como indução de proteção ou imunidade adquirida, envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos prévios com agentes bióticos (por ex. microrganismos viáveis ou inativados) (Madamanchi & Kuć, 1991) ou abióticos (por ex. metais pesados) (Kessmann et al., 1994).

Como regra geral na natureza, as espécies vegetais possuem mecanismos eficientes que impedem o estabelecimento e o desenvolvimento da maioria dos organismos patogênicos, porém, alguns conseguem vencer as defesas da planta e ocasionar a doença. Deste modo, resulta o conceito de que a resistência é a regra e a suscetibilidade uma exceção (Moraes, 1991; Lopez, 1993; Pascholati & Leite, 1994).

Segundo Moraes (1991), os mecanismos de defesa não se restringem apenas a processos puramente bioquímicos. Esses mecanismos podem também expressar-se por alterações estruturais e físicas, que vão agir como barreiras mecânicas na tentativa de

bloquear ou anular a atividade de um microrganismo, embora os mecanismos bioquímicos de defesa sejam os mais importantes na expressão de resistência genética das plantas.

Pesquisadores indagavam sobre a existência ou não desses mecanismos em todas as plantas e porque só em alguns casos eles se manifestavam. Isto levou a idéia de que talvez os mecanismos de resistência pudessem estar apenas reprimidos ou inativos nas espécies ou cultivares suscetíveis. Mas como poderiam então serem ativados estes genes responsáveis pela resistência? Todas as plantas possuem informações genéticas para a resistência à todos os patógenos, e é da habilidade do patógeno induzir à expressão dessas informações genéticas, que resulta o estado de resistência em uma interação incompatível (Martins, 1991).

De acordo com muitos autores, é possível alterar-se o estado de resistência ou sucetibilidade das plantas, através de tratamentos prévios com microrganismos inativados ou não (Kuć et al., 1975; Pascholati et al.,1986; Guzzo et al., 1987 a,b; Stermer & Hammerschmidt, 1984), sensibilizando-as ou protegendo-as sistemicamente contra doenças causadas por fungos necrotróficos (Elliston et al., 1971), biotróficos (Tuzun & Kuć, 1985), bactérias (Carrol & Lukezic, 1972) ou vírus (Ross, 1961).

O fenômeno de imunização de plantas contra patógenos já era conhecido há mais de 100 anos, segundo Ray[1], citado por Moraes (1991), no qual o autor relata a "vacinação de plantas" com formas atenuadas de ferrugens, e segundo Bernard[2], citado por Moraes (1991), que demonstrou que a inoculação de bulbos de orquídea com um isolado fraco de *Rhizoctonia repens* os protegia de uma posterior inoculação com isolados do patógeno.

Ward (1905) e Stackman (1915) observaram também que plantas de trigo expostas a isolados avirulentos de fungos causadores de ferrugem, mostraram-se resistentes quando da inoculação de isolados virulentos do mesmo patógeno. Após a demonstração do fenômeno de indução de resistência em plantas, começou-se a gerar um

---

[1] RAY, J. Cultures et formes attènuès des maladies cryptogamiques des vègètaux. **Compts Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Siences**, v. 133, p. 307-309, 1901.

[2] BERNARD, N. Lévolution dans la symbiose, des orchide's et leurs champignons commonsaux. **Analles dans Sciences Naturales,** v. 9, p. 1-196, 1909.

enorme volume de informações sobre o assunto. Estes estudos estão concentrados no entendimento dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos da ativação dos mecanismos latentes de resistência.

2.3.3.1 Características da indução de resistência

A ativação dos genes responsáveis pelo mecanismo de resistência, tornando as plantas mais resistentes aos patógenos, envolve a ativação de mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamentos com elicitores (indutores). Os elicitores podem ser divididos em bióticos e abióticos: **a) bióticos**: microrganismos saprófitas, o próprio patógeno ou patógenos de outras culturas, formas virulentas, avirulentas ou inativas, metabólitos microbianos e extratos de plantas sadias ou imunizadas (Sequeira, 1979; Kuć & Rush, 1985; Duke et al, 1987; Moraes,1989,1990). **b) abióticos**: luz UV, injúria mecânica com abrasivo carburundo (carbureto de silício + óxido de alumínio), tratamento com $HgCl_2$, e nitrogênio líquido (Freitas et al., 1993; Pascholati & Leite, 1995), ácido acetil salicílico (Klessig, 1994) e quitosana (Hadwiger et al.,1994; Benhamou et al., 1994).

A principal característica do fenômeno de indução de resistência reside no fato de que a ação do indutor se faz sentir no metabolismo da planta hospedeira, modificando-o de forma a que possa atuar nas fases de desenvolvimento pós-penetração do patógeno (Moraes, 1991). A indução de resistência é dependente do **intervalo de tempo** entre o tratamento inicial (com elicitor) e a inoculação do patógeno. Em qualquer sistema empregado, a proteção não é imediata, mas pode ser verificada somente após um período adequado. Esta dependência de tempo indica que mudanças específicas no hospedeiro, envolvendo a síntese ou acúmulo de metabólitos, são importantes no fenômeno de resistência induzida (Silva, 1989).

Também podemos citar outra característica, como exemplo a **dependência de luz** onde a planta requer energia para a síntese e movimento dos metabólitos. Lozano & Sequeira (1970) demonstraram, que a luz era necessária à manifestação da proteção,

quando folhas de fumo eram infiltradas com células de *Pseudomonas solanacearum* termicamente inativadas e inoculadas com o mesmo patógeno. Em folhas mantidas no escuro não havia proteção, enquanto que folhas mantidas em fotoperíodo de 12 horas, a proteção era observada.

Segundo Moraes (1991), a **velocidade de expressão** dos mecanismos de resistência pós-formados estruturais ou bioquímicos são de vital importância no bloqueio ou não do patógeno. Marley & Hillochs (1993) demonstraram que a velocidade de acúmulo da fitoalexina cajanol no cultivar ICP 9145 foi dez vezes mais rápida que no cultivar Malawi. Através da inoculação de *Fusarium udum* em ambos os cultivares, foi observado que apenas o cultivar ICP 9145 apresentava resistência ao patógeno.

A **concentração do elicitor** para a proteção de plantas também pode afetar a resistência da planta. Caruso & Kuć (1979), utilizando-se de *Colletotrichum lagenarium* como indutor de resistência em folhas de melão e melancia, através da aplicação de uma suspensão de 10^3 conídios/mL, obtiveram proteção em torno de 90 a 95% respectivamente, para uma posterior infecção com patógeno. Quando do aumento da concentração da suspensão elicitora para 10^7 conídios/mL, o efeito protetor caiu para 35 e 13%, respectivamente. Roncatto & Pascholati (1993) evidenciaram a produção de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo, em função do tratamento com suspensões e filtrados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtidas de "Fermento Biológico Fresco Fleischmann". Observou-se também que o aumento da resposta de defesa (síntese de fitoalexinas) foi linear ao aumento da concentração da levedura aplicada.

As respostas de proteção induzida por prévia inoculação também parecem ser sensíveis à **temperatura**. A resistência que se desenvolve em plantas de fumo como resultado da formação de lesão local por estirpes de vírus do mosaico do fumo (TMV) ocorre em plantas crescidas a 20-24° C, mas não ocorre em plantas a 30° C (Klemente & Goodman, 1968).

Outra característica da indução de resistência é que dependendo do indutor e da planta utilizados, a **duração do efeito protetor** poderá ser de poucos dias até algumas

semanas, ou mesmo por todo o período de vida da planta. Segundo Kuć et al. (1975), quando plantas de pepino foram inoculadas repetidamente com *Colletotrichum lagenarium*, a resposta de proteção contra o mesmo fungo permaneceu viável por dez semanas.

A **não especificidade** da resistência induzida em plantas é refletida não somente pelos diferentes indutores passíveis de uso, mas também no amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida (Pascholati & Leite, 1995). De acordo com Dean & Kuć (1986), o tratamento indutor da folha primária de plantas de pepino com suspensões de *C. lagenarium* permite uma proteção sistêmica contra pelo menos treze fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus.

A proteção induzida pode se manifestar **local** ou **sistemicamente**, à distância do ponto de aplicação do indutor e penetração do patógeno. Como exemplo, pode-se citar a indução da proteção local em folhas de plantas de melão contra *Mycosphaerella melonis*, através do uso do próprio patógeno inativado termicamente, tendo como conseqüência uma redução no número e tamanho das lesões ocasionadas por *M. melonis* no tecido foliar (Pascholati et al., 1986). Martins (1991) demonstrou que o tratamento da metade de uma folha de café com indutor (filtrado autoclavado de uredósporos de *Hemileia vastatrix*) desencadeava um estímulo protetor contra *H. vastatrix* que se propagava para a outra metade da folha, não tratada. Verificou-se também que o tratamento de uma folha com o indutor protegia a folha oposta. A resistência induzida estaria relacionada com outras respostas da planta que não o acúmulo de fitoalexinas e seria dependente de um "sinal" químico emitido pelas células a partir do ponto da aplicação do indutor, que sensibilizaria tecidos distantes do hospedeiro para responder rapidamente quando inoculados (Dean & Kuć, 1985).

A resistência induzida nas plantas pode ser transmitida por **enxertia**. Jenns & Kuć (1979) observaram que, em pepino, um sinal para imunização pode ser transmitido do porta-enxerto com resistência induzida para o enxerto, tornando-o também protegido.

2.3.3.2 Agentes bióticos induzindo resistência

As plantas reagem ao ataque de microrganismos patogênicos e outras injúrias com uma multiplicidade de reações químicas conhecidas como respostas de defesa ou resposta de estresse (Dixon & Lamb, 1990; Hahlbrock & Scheel, 1989). Estudos com plantas intactas e culturas de células de plantas tem mostrado que o estímulo químico, denominado de elicitor derivado do patógeno ou da parede de células das plantas, pode induzir o mesmo grupo de respostas de estresse (Boller, 1989; Hahlbrock & Scheel, 1989; Dixon & Lamb, 1990). Por sua vez, a indução de mecanismos de resistência de plantas por aplicação de elicitores tem sido sugerida como uma alternativa para o controle de doenças de plantas (Cartwright et al, 1977; Schönbeck & Dehne, 1986; Lyon et al., 1990). Nesse sentido, elicitores de diferentes estruturas tem sido isolados de filtrados de cultura, parede de células, e membranas de fungos fitopatogênicos (Boller, 1989; Hahlbrock & Sheel, 1989). Esses compostos que podem ser de origem microbiana (elicitor exógeno) ou da própria planta (elicitor endógeno), são formados, de um modo geral, por moléculas complexas, englobando carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lipídios.

A luz ultravioleta ou metal pesado (por ex. $HgCl_2$), injúria mecânica com carburundo, tratamento com NaCl, os quais causam alguma forma de estresse nas plantas, foram demonstrados por Freitas et al. (1993) serem agentes abióticos capazes de induzir o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Outros agentes abióticos como detergentes, aquecimento ou resfriamento, também induzem o acúmulo de fitoalexinas em plantas (Bailey, 1982).

Os elicitores de origem microbiana podem ser representados por fungos, células bacterianas, partículas virais, homogenatos livres de células etc. No caso dos elicitores endógenos, os mesmos são formados por fragmentos de material constituinte da parede celular da planta (oligogalacturonídeos), os quais são liberados pela ação de enzimas degradadoras da parede, produzidas por fungos e bactérias ou pelas próprias células danificadas da planta (Pascholati & Leite, 1995).

2.3.3.2.1 Uso da *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas

Leveduras, as quais não são patogênicas às plantas, tem potencial para proteger as plantas contra patógenos (Fokkema et al., 1979; Hahn & Albershein, 1978; Martins et al., 1986; Williamson & Fokkema, 1985). Martins et al. (1986) demonstraram que a aplicação de filtrados de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) em folhas destacadas de cafeeiro (*Coffea arabica*) cv. Mundo Novo, 72 h antes da inoculação com urediniosporos de *Hemileia vastatrix*, induzia resistência nas folhas de cafeeiro sem afetar a germinação e formação de apressórios de urediniosporos de *H. vastatrix*. Por sua vez, a proteção de plantas de café por *S. cerevisiae* foi demonstrada por Roveratti (1989), onde a mesma somente se manifestou nos tratamentos realizados antes ou simultaneamente à inoculação com *H. vastatrix*. Nos tratamentos onde foram utilizadas células vivas ou autoclavadas da levedura, verificou-se uma inibição significativa da germinação de urediniosporos, enquanto que os filtrados de células vivas ou autoclavadas não foram eficientes em proteger as folhas da planta contra a ferrugem.

Outro trabalho envolvendo o uso da levedura *S. cerevisiae* no controle de doenças consistiu na aplicação de diferentes concentrações de suspensões aquosas de produtos comerciais contendo células da levedura ou de *Bacillus thuringiensis* (1-20 mg/mL), o que reduziu a severidade da antracnose em plantas de sorgo, mantidas sob condições de casa-de-vegetação (Lopez, 1991).

Silva & Pascholati (1992) demonstraram que suspensões ou filtrados de *S. cerevisiae* obtidas de fermento comercial de padaria ("Fermento Biológico Fresco Fleischmann"), reduziram o desenvolvimento de *C. graminicola*, bem como a expressão da antracnose em folhas de milho, quando estas foram previamente ou concomitantemente tratadas com estas preparações.

A proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *S. cerevisiae* foi demonstrada por Stangarlin & Pascholati (1994), onde testes realizados *in vitro* mostraram uma redução na germinação dos conídios do patógeno, tanto na presença de suspensão de células de levedura, quanto do filtrado da mesma. Embora os experimentos *in vivo* tenham evidenciado uma redução na germinação dos

conídios e na penetração do tecido foliar pelo fungo, a suspensão de levedura estimulou a formação de apressórios por *E. turcicum*.

Reglinski et al. (1994) obtiveram um elicitor ativo de extrato da levedura *S. cerevisiae*, o qual reduziu a infecção de míldio pulverulento em cevada e manteve a produção no campo.

O uso de *S. cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo, maracujá-azedo amarelo e eucalipto contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos foi verificado por Piccinin (1995), onde os resultados indicaram a inexistência de especificidade no controle de diferentes patógenos por *S. cerevisiae*, além do efeito da proteção ser inespecífico para o hospedeiro. Segundo Hahn & Albersheim (1978), a levedura *S. cerevisiae* possui um poderoso elicitor do acúmulo de gliceolina em tecidos de soja. O extrato de levedura, com o qual o presente elicitor foi estudado não é conhecido ser patógeno de nenhuma planta.

Entre 60 a 90% da parede de *S. cerevisiae* é composta por polissacarídeos, sendo o restante composto principalmente de proteínas e lipídios. A maior parte dos polissacarídeos são glucanas e fosfomananas (Rose, 1993). A glucana está unida a proteína e representa o componente estrutural mais abundante, localizado na parte externa da parede. A manana encontra-se também ligada à proteína, às vezes através de hexosamina, e tende a localizar-se na parte externa da parede (Hough, 1990).

Segundo Vukovic et al. (1994), relataram que a parede celular da levedura é composta de uma glucana na qual diferentes manoproteínas estão dispersas. De acordo com Power & Challinor (1969), determinados polissacarídeos presentes nas paredes celulares de fungos e leveduras, têm um papel importante na rigidez da parede e manutenção da morfologia celular (quitina e glucana), enquanto que outros estão mais diretamente envolvidos com a resposta imune (mananas, fosfomananas, galactomananas e ramnomananas).

Em *S. cerevisiae,* a principal glucana presente na parede celular mostra-se álcali e ácido insolúvel com ligação β (1,3) e há também uma pequena proporção de glucana β (1,6), a qual é solúvel em condições não alcalinas, e tem massa molecular relativamente baixa (Rose, 1993).

Segundo Williams et al. (1991), quanto ao interesse na indústria farmacêutica, a glucana isolada de *S. cerevisiae* tem sido referida com propriedades imunoestimulantes. Essa glucana pertence a classe de drogas conhecidas como modificadoras da resposta biológica ("Biological Response Modifiers" - BRMs). O efeito benéfico foi demonstrado em uma variedade de patologias experimentais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas, atuando como modificadora da supressão imunológica e também de doenças neoplásicas. Isso tem estimulado pesquisas no potencial de aplicações biomédicas dessa β-glucana. Com o interesse nesse potencial terapêutico da glucana, foram desenvolvidos estudos para se converter a β-glucana na forma solúvel em água, não tóxica e ativa imunologicamente, para administração parenteral.

2.3.3.2.2 Indução de resistência em gramíneas

Vários trabalhos nos últimos anos mostraram a possibilidade do controle de doenças de plantas utilizando-se microrganismos para a indução de resistência ou controle biológico. Silva (1989) demonstrou que a antracnose causada por *C. graminicola* em plantas de milho mantidas em casa-de-vegetação, foi controlada pelo emprego de preparações de *S. cerevisiae*. A seguir, Lopez (1991), utilizando de plantas de sorgo tratadas com vários microrganismos potencialmente antagonistas, inclusive *S. cerevisiae*, demonstrou que as mesmas eram protegidas contra a antracnose causada por *C. graminicola*.

Outros autores também demonstraram a indução de resistência em plantas, mais especificamente gramíneas, em condições controladas (Stangarlin & Pascholati, 1994) e em campo (Piccinin, 1995). Portanto, a indução de resistência mostra-se como um dos métodos de controle de doenças com um grande potencial de uso, devido a possibilidade de se obter proteção de modo sistêmico e duradouro, além de possibilitar a combinação com outros métodos de controle de doenças para um manejo integrado (Sequeira, 1983).

2.3.3.3 Indução de resistência sistêmica

A indução de resistência sistêmica (IRS) é definida atualmente como a indução de resistência à doenças em uma planta a distância do ponto de aplicação do indutor, pela prévia inoculação com um agente infeccioso, exposição à influência ambiental ou tratamento com substância química, os quais podem ou não ter atividade antimicrobiana *in vitro* (Kuć, 1995). A IRS resulta na expressão ou aumento da expressão de múltiplos mecanismos para resistência a doenças, embora, o agente infeccioso não seja necessário para a indução de resistência sistêmica.

Compostos como fosfatos, oxalatos, ácido salicílico (AS), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), paraquat (PQ) e ácido l-3-amino-n-butírico, elicitam a indução de resistência sistêmica (Cohen, 1994; Kessman et al., 1994). Madamanchi & Kuć (1991) citam trabalhos de vários autores onde a indução de resistência sistêmica é descrita para muitas plantas como pepino, melancia, feijão verde, cevada, pêra, ameixa, café, batata, maçã e cevada. O largo espectro de patógenos e agentes químicos usados para induzir a resistência mostra que a mesma pode ser efetiva contra vírus, fungos, bactérias e nematóides.

A indução de resistência sistêmica ativa vários mecanismos de resistência natural do hospedeiro e portanto pode ser muito durável e estável ao contrário de fungicidas sistêmicos, baseados em um único sítio de ação. Segundo Madamanchi & Kuć (1991), os mecanismos ativados na indução de resistência sistêmica envolvem: formação de papila e calose, aumento na atividade da peroxidase, acúmulo de glicoproteínas-ricas em hidroxiprolina, lignificação, produção de fitoalexina, quitinases, β- 1,3- glucanases e acúmulo de outras proteínas-RP. Além disso, pode englobar a morte das células hospedeiras no sítio de infecção (reação de hipersensibilidade) (Malamy & Klessig, 1992) e a produção de espécies ativas de oxigênio (Mehdy, 1994).

Segundo Ryals et al. (1994), a IRS parece ser distinta de mecanismos de resistência preexistentes, como barreiras físicas e também por outros mecanismos induzíveis, como a biossíntese de fitoalexinas, reação de hipersensibilidade e etileno.

Porém, a indução de resistência sistêmica não é relatada ocorrer em resposta a injúria ou estresse osmótico.

De acordo com Neuenschwander & Friedrich (1995), a IRS onde a infecção pelo patógeno libera um sinal no floema, o qual movimenta-se por toda planta e é percebido e transportado para outros órgãos não infectados, inicia a resposta sistêmica adquirida (RSA), a qual é mantida por vários dias ou semanas. Os sinais que coordenam o complexo de mudanças envolvidas na indução de respostas de resistência não são totalmente conhecidos. O ácido salicílico (AS) foi sugerido como um dos candidatos ao sinal que se move através do floema a longas distâncias (Malamy & Klessig, 1992), porém foi demonstrado através de experimentos que o AS não é um sinal sistêmico, mas é necessário para o desenvolvimento da RSA (Kessmann et al, 1994; Leite et al., 1997). Outros candidatos são citados como etileno, sistemina, jasmonato e o próprio potencial elétrico (Malamy & Klessig, 1992).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi proposto agir como um mensageiro secundário do ácido salicílico na RSA (Chen et al., 1993). Estes autores sugeriram que o papel do ácido salicílico na transdução em RSA seria a inibição da catalase, o que poderia elevar os níveis de peróxido de hidrogênio. Porém, recentemente verificou-se que não há acúmulo de H_2O_2 em tecidos desenvolvendo RSA, e que este não induz RSA em plantas transgênicas que não acumulam AS. Adicionalmente, a indução de uma proteína RP em fumo por H_2O_2, só ocorre na presença de AS, indicando que o H_2O_2 não é um mensageiro secundário durante a indução de RSA por AS (Neuenschwander et al., 1995). Assim o efeito inibitório de AS sobre a atividade da catalase pode ser importante somente para a contenção do patógeno na região do sítio de infecção.

Segundo Friedrich et al. (1996), o fumo é um dos melhores sistemas caracterizado para o estudo de RSA. A infecção por TMV ("Tobacco Mosaic Virus") causando lesões locais no hospedeiro, leva ao desenvolvimento de resistência contra o próprio TMV, assim como resistência contra outras viroses (Ross, 1961), fungos e bactérias (McIntyre et al.,1981; Vernooij et al., 1995). Entretanto, a RSA não é efetiva contra todos os patógenos de fumo (Vernooij et al.,1995), existindo um espectro definido

de patógenos que serve para se distinguir a resposta RSA de outras respostas de resistência a doenças.

A RSA é também caracterizada pelo acúmulo coordenado de mRNAs, codificados por um grupo de genes RSA (Ward et al., 1991). A expressão deste grupo de nove famílias de genes, os quais incluem muitos dos genes que codificam proteínas-RP, também servem como um critério que pode distinguir RSA de outras respostas de resistência. Assim, em fumo a RSA pode ser definida como uma resposta induzível de resistência sistêmica de doença que provê proteção contra um grupo específico de patógenos e está associada com a expressão de um grupo particular de genes.

Lusso & Kuć (1995) demonstraram o fenômeno da indução de resistência sistêmica utilizando folhas de fumo inoculadas com TMV ou *Peronospora tabacina,* tratadas previamente com TMV, onde observou-se aumentos nas atividades de ribonuclease e protease, que são enzimas produzidas após a infecção, como resposta de defesa da planta. Uknes et al. (1993), utilizando a planta *Arabidopsis thaliana,* demonstraram que esta exibia RSA à uma bactéria e fungo patogênicos, após tratamento com INA (ácido 2,6- dicloroisonicotínico). Por sua vez TCV ("Turnip Crinkle Virus"- vírus do encrespamento do nabo) induziu RSA em *A. thaliana* contra *Pseudomonas syringae* e TCV. Altos níveis de ácido salicílico foram encontrados em resposta à infecção com TCV, sendo que o ácido aplicado exogenamente induzia resistência contra fungo *Peronospora parasitica* em *A. thaliana.*

Hoffland et al. (1995) demonstraram que uma raça não patogênica de *Pseudomonas fluorescens* WCS417r induziu resistência sistêmica em rabanete contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*. Os autores afirmaram que o acúmulo de proteínas-RP não foi um pré-requesito para a indução de resistência sistêmica. AS e INA também foram usados como indutores para comparação, sendo que *P. fluorescens* raça WCS417r e AS induziram resistência, enquanto que *P. fluorescens* raça WCS417r - B4 (mutante lipopolissacarídeo) e INA não induziram. A indução de resistência foi expressa na redução da porcentagem de plantas doentes, mas não na severidade da doença.

Benhamou et al. (1994) demonstraram que sementes de tomate, tratadas com quitosana exibiram resistência sistêmica à infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-*

lycopersici em plântulas, desencadeando resposta de hipersensibilidade nos sítios de infecção do fungo. O crescimento e o desenvolvimento do patógeno foram alterados pelo rápido acúmulo de β-1,3 glucanases, fenóis e compostos semelhantes a lignina.

Finalmente, tem sido proposto que a RSA pode servir como base para modernas estratégias de controle de doenças, as quais incluem engenharia genética de plantas e novas substâncias químicas protegendo as mesmas (Kuć, 1982; Ryals et al.,1994).

2.3.3.3.1 Indução de resistência x hidrolases

Como comentado acima, em um grande número de espécies de plantas, a resistência pode ser induzida contra um grande número de patógenos pelo prévio tratamento das plantas com certas substâncias químicas ou compostos de origem biológica, variando de sais inorgânicos, à frações de paredes celulares de fungos. A pré-inoculação com patógenos ou não patógenos, pode também induzir resistência, o que leva a consideração de que os patógenos ou susbtâncias químicas estimulam o mesmo sinal nas vias de transdução.

Dentre os mecanismos, bioquímicos de defesa das plantas como comentado no ítem 2.4.2. "Proteínas relacionadas à patogênese", temos as enzimas hidrolíticas quitinase e β-1,3-glucanase. Cachinero et al. (1996) relataram a indução de diferentes isoenzimas de quitinase e β-1,3-glucanase em plantas de girassol (*Helianthus annuus*) em resposta a infecção por *Plasmopara halstedii*. Os resultados desses autores sugerem que quitinases e β-1,3-glucanases extracelulares em girassol podem ser parte de uma bateria de defesas da planta contra *P. halstedii*. A atividade de ambas pode agir inibindo o crescimento do fungo e limitando a colonização na planta.

Segundo Guzzo & Martins (1996), as enzimas β-1,3-glucanase e quitinase foram induzidas local e sistemicamente após aspersão das folhas de plantas de café com suspensão de *Bacillus thuringiensis* (formulação comercial). O tratamento induziu resistência local e sistêmica contra *Hemileia vastatrix*, após a aplicação do indutor. Por sua vez, Wubben et al. (1993) relataram o acúmulo de quitinase e β-1,3-glucanase na

epiderme inferior de folhas de tomateiro (próximo aos estômatos), infectadas com *Cladosporium fulvum*. Os autores sugeriram que a rapidez no acúmulo e a atividade específica das enzimas hidrolíticas, podem ser fatores importantes para o sucesso da planta na defesa contra patógenos em potencial.

Roulin & Buchala (1995) descreveram a indução de β-1,3-glucanases e outras enzimas em folhas de noz da terra infectadas com *Cercospora arachidicola*. Os autores observaram também que o tratamento das plantas com 200 μM de cloreto de mercúrio, induzia o acúmulo idêntico de β-1,3-glucanases extracelulares. Durante o curso da infecção um aumento na atividade da peroxidase foi observado, mas a atividade da quitinase permaneceu constante.

A indução de quitinases em plantas de fumo sistemicamente protegidas contra mofo azul do fumo por *Peronospora tabacina* ou TMV foi relatada por Pan et al. (1992). Os autores sugeriram que a indução de quitinases pode ser considerada uma das respostas metabólicas gerais participando na resistência, cada uma das quais induzidas não seletivamente e sendo efetivas contra muitos patógenos. A expressão coordenada de muitos mecanismos diferentes de resistência pode restringir o desenvolvimento de diversos patógenos e parece ser responsável pela indução de resistência de plantas suscetíveis e resistência de plantas não induzidas à resistência. Ambas as classes de resistência são determinadas pela regulação da rapidez e magnitude da expressão dos genes envolvidos nos mecanismos de resistência.

2.3.3.3.2 Sinalizadores moleculares

O entendimento das bases bioquímicas dos mecanismos de sinalização que regulam a expressão gênica das plantas é atualmente objetivo de grande importância na biologia das plantas. Investigações estão sendo conduzidas para se elucidar o mecanismo de ação de tradicionais hormônios de plantas e reguladores de crescimento, e para se identificar outros sinalizadores moleculares que iniciam a expressão de genes durante o estresse e o desenvolvimento das plantas (Ryan & Farmer, 1991). Assim, os recentes candidatos considerados como sinalizadores moleculares em potencial, foram identificados

como oligossacarídeos (Darvill & Albersheim, 1984; Ryan, 1987), polipeptídeos (Schottens-Toma & De Vitti, 1988) e pequenas moléculas como o ácido aracdônico (Bostock et al., 1981), ácido abscísico (Pena-Cortes et al., 1989), ácido jasmônico (Anderson, 1989; Farmer & Ryan, 1990), Ca^{2+} (Poovaiah, et al., 1987; Young & Kauss, 1983) e fosfato inositol (Morse et al., 1989). Entretanto os oligossacarídeos tem sido os mais extensivamente estudados. Eles parecem ter múltiplos papéis nos sistemas que regulam a transdução de sinais, ambos na defesa de plantas e no processo de desenvolvimento.

Segundo Leite et al. (1997), o reconhecimento do microrganismo pela planta é fundamental para o desencadeamento de respostas celulares que abortarão o processo de infecção e/ou colonização. Sem reconhecimento o microrganismo pode invadir a planta e causar a doença.

O processo de reconhecimento e transdução de sinais em interações plantas-fungos tem início com a ligação de um sinal externo (elicitor) a um possível receptor na superfície da célula vegetal. Por intermédio do receptor, o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando moléculas chamadas de mensageiros secundários. Essas moléculas irão em última análise, amplificar o sinal e regular a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações compatíveis (suscetíveis) ou incompatíveis (resistentes).

Segundo Braga et al. (1993), elicitores derivados de fungos e plantas superiores tem diferentes estruturas moleculares sugerindo que pode haver diferentes meios de interação para exercer sua atividade elicitora. Dois tipos de interações tem sido descritas para elicitores fúngicos. O primeiro tipo está bem caracterizado pelo direto reconhecimento das plantas às moléculas originadas de fungos (elicitores exógenos), como por exemplo os fragmentos de polissacarídeos da parede celular, assim como as β-glucanas, quitina e quitosanas. O segundo tipo de interação requer como primeiro passo a degradação da parede celular das plantas por enzimas hidrolíticas de microrganismos. Os produtos resultantes da degradação (elicitores endógenos) podem interagir com receptores das plantas.

Na década de 70, Albersheim e colaboradores demonstraram que a purificação da parede celular de certos fungos patogênicos produzia potentes elicitores da síntese de fitoalexinas em tecidos de plantas. A atividade dos elicitores foi inicialmente associada com frações de polissacarídeos do tipo β-glucanas (Ayres et al., 1976b). Mais recentemente, a atividade indutora de β-glucanas derivadas de paredes celulares fúngicas, geradas por enzimas hidrolíticas de plantas, foi demonstrada ter propriedades de um fragmento hepta β-glucosil (Sharp et al., 1984). Isto implica que as vias de sinalização para genes de defesa em plantas respondem ao ataque de patógenos por sinais químicos, por exemplo os fragmentos de β-glucanas, derivados da parede celular de patógenos, durante o processo de infecção (Ayres et al., 1976a; Darvill & Albersheim, 1984).

No final dos anos 70 e início dos anos 80, outros polissacarídeos foram encontrados ativando as respostas de defesa das plantas. Fragmentos do tipo oligogalacturonídeos das paredes celulares de plantas, gerados pela ação de poligalactorunases e pectina liase, ativaram a síntese de fitoalexinas em soja e inibiram a síntese de proteinase em folhas de tomate (Darvill & Albersheim, 1984; Hahn et al., 1981). Enquanto que outros fragmentos de polissacarídeos de paredes celulares fúngicas, tipo quitinas liberadas durante o ataque do patógeno na interação ervilha-*Fusarium solani*, foram potentes indutores de respostas de defesa das plantas (Hadwiger & Beckman, 1980).

Durante o início da patogênese, enzimas pécticas secretadas pelos patógenos, depolimerizam a parede celular e solubilizam oligouronídeos que podem agir como sinais que iniciam respostas localizadas de defesa (Darvill & Albershein, 1984; Ryan, 1987). Muitas respostas de indução em várias plantas por oligouronídeos envolvem a síntese de β-glucanases e quitinases que podem fragmentar a parede celular dos fungos. Esses oligômeros podem também agir como potentes moléculas sinalizadoras, amplificando os sinais para a defesa localizada (Ryan & Farmer, 1991).

Segundo Leite et al (1997), o envolvimento de receptores na comunicação entre plantas e fungos patogênicos não foi ainda estabelecido, mas existem muitas provas que levam a acreditar que esse seja um processo análogo ao que ocorre em células animais

para percepção de estímulos extracelulares. Dentre essas evidências, podem-se citar a ocorrência de sítios de ligação de alta afinidade para várias moléculas elicitoras na membrana plasmática de plantas (Cheong & Hahn, 1991; Cosio et al., 1992), a clonagem de um gene codificando um receptor para a β-glicana elicitora em soja (Umemoto et al., 1996), e um receptor com atividade de quinase de proteínas estruturalmente relacionado com proteínas-RP (Wang et al.,1996).

Segundo Gennis (1989), com base nos sistemas de reconhecimento e transdução de sinais em células animais, tem sido estabelecido que, após a interação do ligante com o receptor, pelo menos três tipos de eventos podem ocorrer: a) abertura de um canal de íons; b) ativação de uma quinase de proteínas no citoplasma, considerando-se que o receptor possui um domínio intracelular capaz de fosforilar proteínas; c) produção de mensageiros secundários. Entre os mensageiros secundários identificados em células vegetais podemos citar cAMP, Ca^{2+}, quinases de proteínas, proteínas G, Ca-calmodulina, inositol trifosfato (IF3) e espécies ativas de oxigênio (EAO).

Os hormônios vegetais, como etileno e ácido jasmônico, também têm sido apontados como possíveis mensageiros secundários na transdução de sinais moleculares em interações planta-microrganismos (Leite et al., 1997).

2.4 Aspectos bioquímicos gerais da defesa

Dentro do contexto de Fisiologia do Parasitismo, a resistência pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (Goodman et al., 1986 ; Heitefuss & Williams, 1976). Essa resistência é caracterizada pela sua natureza dinâmica e coordenada, onde a efetividade da ação depende da expressão dos seus mecanismos em uma seqüência lógica, após o contato do patógeno em potencial com o hospedeiro (Bell, 1980; Graham & Graham, 1991; Kuć, 1987 e Madamanchi & Kuć, 1991). Além disso, a resistência mostra-se como um sistema multicomponente, onde o seu nível resulta do somatório das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (Bell, 1980; Kuć, 1987; Madamanchi & Kuć, 1991; Misaghi, 1982).

As plantas se defendem do ataque dos patógenos mediante características estruturais que atuam como barreiras físicas e impedem que o patógeno penetre e se propague nelas, ou por meio de reações bioquímicas que tem lugar em suas células e tecidos, as quais produzem substâncias tóxicas para o patógeno e criam condições que inibem o seu desenvolvimento (Agrios, 1997).

Segundo Pascholati & Leite (1994), os fatores de resistência ou mecanismos de resistência estão divididos em dois blocos: os pré-formados (passivos/constitutivos) e os pós-formados (ativos/ induzíveis)

a) Pré-formados (passivos/ constitutivos)

Estruturais : cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores;

Bioquímicos: fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, fototoxinas, quitinases e β-1,3 glucanases.

b) Pós-formados (ativos/ induzíveis)

Estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses;

Bioquímicos: fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese (proteínas-RP).

Segundo Agrios (1997), as células e tecidos vegetais respondem aos danos ocasionados pelos patógenos, mediante uma série de reações bioquímicas, que produzem substâncias tóxicas em altas concentrações para inibir o desenvolvimento dos mesmos. Dentre essas substâncias estão incluídos a maioria dos compostos fenólicos, como os ácidos clorogênico e cafeico, os produtos da oxidação dos compostos fenólicos, e as fitoalexinas que em sua maioria são também compostos fenólicos. Outros compostos são citados por Pascholati & Leite (1994), dentre eles os alcalóides, lactonas e glicosídeos cianogênicos.

2.4.1 Peroxidases

A defesa ativa das plantas contra fitopatógenos pode envolver alterações metabólicas, as quais podem ser correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário (Fric, 1976). Entre essas enzimas-chave

estão as: peroxidases, ribonucleases, proteases, fenilalanina amônia - liase (FAL), polifenoloxidase etc.

A enzima peroxidase ocorre em tecidos de plantas (Hoagland, 1990), em certas células animais (Lück, 1965) e microrganismos (Kosugue, 1969; Hoagland, 1990). As peroxidases são hemeproteínas (Van Huystee, 1987) e têm sido relatadas em uma grande variedade de plantas, consistindo de múltiplas isoenzimas (Maehly, 1955). Várias funções são desempenhadas pela enzima: nos processos de reparo de ferimentos, catalisando a formação de uma barreira impermeável pelo depósito de polímeros alifáticos e fenólicos (Espelie et al., 1986); além de estarem envolvidas em diversos processos fisiológicos, como dormência, organogênese, senescência, lignificação e produção de etileno (Mohan & Kolattukudy, 1990) e oxidação de compostos fenólicos, os quais acumulam-se em resposta à infecção (Pollock & Drysdale, 1976; Rathmell, 1973).

2.4.1.1 Características de peroxidases

A peroxidase (Doador: H_2O_2 oxiredutase, EC 1.11.1.7) é específica para aceptor de hidrogênio, onde somente H_2O_2, metil e etil peróxidos são ativos, porém inespecíficas para os doadores de hidrogênio, que podem ser fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos (Bergmeyer et al., 1974). O pH ótimo da reação depende do doador de hidrogênio (Lück, 1965). O pH ótimo da peroxidase de rábano está em 7,0 quando utilizado o guaiacol como doador de hidrogênio (Bergmeyer et al.,1965). Quanto a estrutura química, as peroxidases são glicoproteínas, que apresentam resíduos de carboidratos, e que contém ou requerem o íon cálcio para estabilidade estrutural e térmica, conforme verificado por Haschke & Friedhoff (1978) em peroxidases de rábano. Apresentam massa molecular entre 30 a 60 kDa (Maehly, 1955; Van Huystee, 1987), porém em batata (*Solanum tuberosum*) a massa molecular pode variar de 48 a 105 kDa (Decedue et al., 1984).

As peroxidases, as quais geralmente costituem em um número de isoenzimas, são capazes de catalisar diferentes tipos de reações oxidativas. As isoenzimas de peroxidase podem diferir nas propriedades bioquímicas, tais como atividade específica,

afinidade pelo substrato, pH ótimo etc. e serem separadas em formas ácidas ou básicas por eletroforese, cromatografia de troca iônica ou focalização isoelétrica (Gaspar et al., 1982). Hamill & Brewbaker (1969), usando planta de milho, observaram através de eletroforese em gel de poliacrilamida, vinte e quatro isoenzimas em extratos obtidos de 250 variedades. Por sua vez, Grison & Pilet (1985a) relataram onze isoperoxidases na fração citoplasmática extraída de raízes de milho. Lusso & Pascholati (1997) encontraram oito isoenzimas em extratos de folhas de milho inoculadas com *H. carbonum*, *H. maydis* ou injuriadas mecanicamente com carburundo no tempo 0. Porém, após 12 horas houve o aparecimento de duas novas isoenzimas e o desaparecimento de três em todos os tratamentos.

2.4.1.2 Reações catalíticas

Quanto as reações catalíticas, as peroxidases reagem reversivelmente com numerosas substâncias, tais como cianeto, sulfeto e fluoreto, formando compostos que podem ser detectados espectrofotometricamente. A enzima pode também ser reduzida por redutores fortes como hidrossulfitos e semiquinonas (Saunders et al., 1964). As reações catalisadas pelas peroxidases podem também ser influenciadas por várias substâncias, exibindo efeitos ativadores ou inibidores (Hare, 1964; Kosuge, 1969, Ku et al., 1970)

2.4.1.3 Inibição de peroxidases

Quanto a inibição das peroxidases, as moléculas podem ser inativadas pela ação de ácidos e bases fortes, sendo essa a principal razão para a perda da atividade da enzima em soluções de pH muito alto ou muito baixo (Saunders et al.,1964).

A adição de substâncias que se ligam a posição 6 do átomo de ferro no grupo prostético, poderá levar a inativação da peroxidase. Como exemplos temos o cianeto, o sulfeto, o fluoreto, além do excesso de peróxido de hidrogênio. Outros íons, como o nitrato, sulfato, cloreto e ferrocianeto exibem menor atividade inibitória sobre as peroxidases (Saunders et al., 1964). Álcoois, açúcares e certos corantes orgânicos são

também capazes de inibir as peroxidases, segundo alguns trabalhos citados por Saunders et al. (1964).

2.4.1.4 Localização da atividade enzimática

Álcazar et al. (1995) demonstraram que a invasão de plantas de pimenta (*Capsicum annuum*) por *Phytophthora capsici* causou um aumento na atividade da peroxidase, a qual era liberada para o espaço intercelular, nas zonas intermediárias (entre zona sadia e necrosada). Vance et al. (1976) observaram a formação de papilas lignificadas e maior atividade de peroxidase nas paredes celulares da epiderme de capim amarelo (*Phalaris arundinacea*), inoculadas com *Helminthosporium avenae*, no sítio de penetração fúngica

Smith & Hammerschmidt (1988) relataram um aumento em dobro na atividade específica da peroxidase extraída de fluídos intercelulares de folhas de pepino, melancia ou melão, exibindo indução de resistência sistêmica quando comparados com o controle.

Em alguns trabalhos citados por Fric (1976), os autores relatam diversos componentes celulares, por exemplo, núcleo, mitocôndria, ribossomos, paredes celulares, membranas celulares, onde as peroxidases podem ocorrer. A localização das peroxidases nas plantas varia com a idade, espécie e grau de diferenciação, sendo a distribuição subcelular diferente para cada tecido. As peroxidases são também encontradas no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e nas vesículas, tanto de células vegetais como de animais (Gaspar et al., 1982).

Inova et al. (1967) propuseram que as peroxidases presentes nas mitocôndrias podem estar envolvidas no sistema de transferência de elétrons de $NADH_2$ para citocromo c. Por sua vez, a peroxidase ribossomal pode catalisar a síntese de novos ribossomos através da regulação dos genes envolvidos na síntese dos mesmos (Stahmann & Demosrest, 1972).

Em raízes de ervilha (*Pisus sativus*), a enzima ocorre principalmente na coifa, epiderme, córtex, endoderme e floema (Hall & Sexton, 1972). Em hipocótilos de feijão

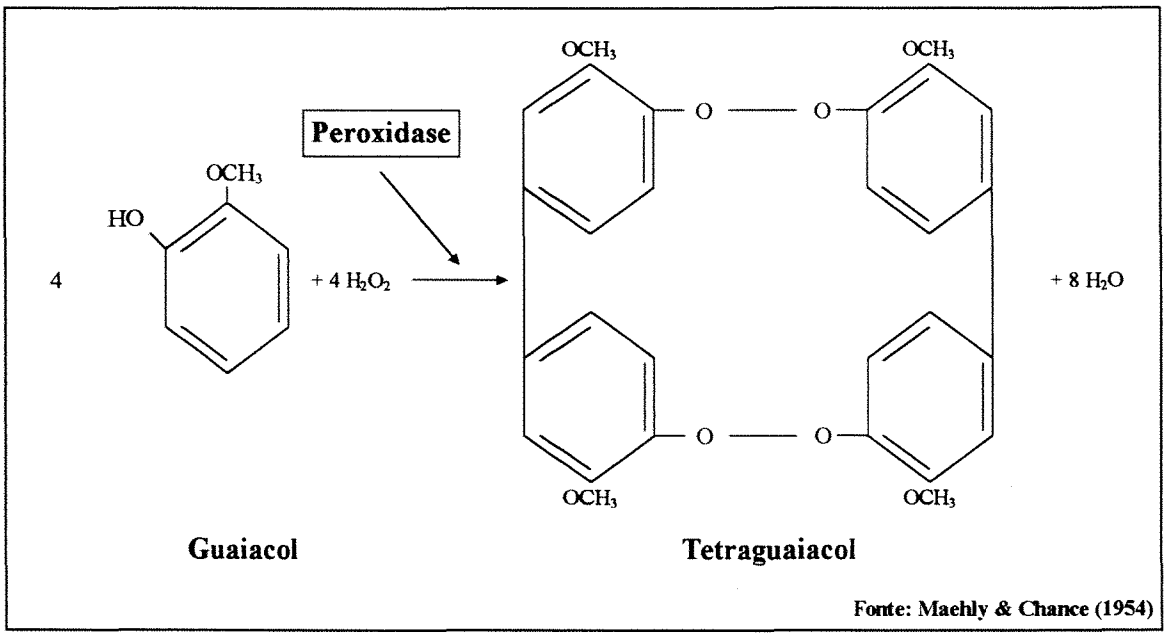
(*Phaseolus* sp), essas enzimas são encontradas no floema, xilema em maturação, epiderme, hipoderme, endoderme e em algumas células do parênquima. Em amendoim, peroxidases ácidas foram localizadas no plasmalema, enquanto que peroxidases básicas foram localizadas nas paredes celulares (Hu et al., 1989). Entretanto, em outro trabalho foram relatadas peroxidases ácidas associadas com paredes celulares de milho (Kim et al., 1988). Por sua vez, Abeles et al. (1988) observaram que as peroxidases básicas de cotilédones de pepino estavam associadas com o plasmalema.

2.4.1.5 Detecção de peroxidases

A detecção qualitativa das peroxidases poderá ser feita com o uso de diferentes substratos, como guaiacol, 1-naftol e hidroquinona (Saunders et al., 1964). Segundo Maehly & Chance (1954), a resina da árvore de guaiaco (*Guajacum officinale*) é a substância mais antiga utilizada em testes para a determinação da atividade das peroxidases e oxidases, sendo ainda hoje amplamente utilizada (Abeles & Biles, 1991; Asiegbu et al., 1993). Outros compostos, como eugenol, triosina, benzidina, seringaldazina, aminas aromáticas, ácidos benzóicos, fenóis, ácidos cinâmicos e cumarinas, vem sendo usados nos estudos com peroxidases (Grison & Pilet, 1985b; Liu, 1975).

Para se avaliar a atividade das peroxidases, a concentração do produto de oxidação ou do substrato não oxidado são determinados quimicamente ou espectrofotometricamente em diferentes tempos de reação. Lück (1965) observou que, na ausência da peroxidase, a oxidação de certos compostos orgânicos pode ser catalisada pelo peróxido de hidrogênio ou traços de metais pesados. Sendo assim, água bidestilada deve ser utilizada no preparo das soluções. Diferentes doadores de hidrogênio, foram utilizados na medida da atividade da peroxidase de rábano, entre eles o *p*-hidroxidifenila, hidroquinona, hidroquinonamonometiléter, guaiacol, catecol, catecolmonometiléter, resorcinol, pirogalol, *o*-fenilenediamina, *m*-fenilenediamina, anilina, *p*- aminobenzoato, ascorbato, dihidroximaleato, urato, NADH (nicotinamida-adenina-dinucleotídio, forma reduzida), nitrito e verde de leucomalaquita, sendo que estas substâncias teriam diferentes velocidades de reação (Bergmeyer et al., 1974).

Quanto a detecção quantitativa, um dos métodos mais adequados para a avaliação da atividade das peroxidases, envolve a oxidação do guaiacol. A oxidação do guaiacol pela ação das peroxidases na presença de H_2O_2 forma o tetraguaiacol. As soluções de tetraguaiacol apresentam coloração castanho, a qual começa a desaparecer pouco tempo após a sua formação. A concentração dessa solução pode ser determinada espectrofotometricamente, se as leituras forem efetuadas em poucos minutos (Maehly & Chance, 1954) a 436 nm (Bergmeyer et al.,1974) e 470 nm (Chance & Maehly,1955; Lusso, 1989).



Maehly & Chance (1954) citam outros compostos utilizados para a avaliação das peroxidases, os quais são: pirogalol, que através de sua oxidação origina a purpurogalina (coloração laranja) e a benzidina que após oxidada produz benzidina azul.

A visualização das peroxidase *in situ* têm sido possível através de diferentes testes histoquímicos. O guaiacol tem sido usado como reagente de coloração (Coffey & Cassidy, 1984), assim como benzidina (Thorpe & Hall, 1984) e pirogalol (Vance et al., 1976). Harkin & Obst (1973) descreveram o teste histoquímico da seringaldazina para peroxidases. O teste demonstrou a participação exclusiva das peroxidases no processo de lignificação.

Álcazar et al. (1995) descreveram um método histoquímico para se visualizar peroxidases em plantas de pimenta em resposta à inoculação com *Phytophthora capsici*, onde foi usado para incubação 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em presença de H_2O_2, mostrando que a atividade da peroxidase ocorria nos espaços intercelulares. Por sua vez, Carrol et al. (1976), utilizando o pirogalol e H_2O_2 para testes histoquímicos em *Phalaris arundinacea*, evidenciou a atividade da peroxidase na parede celular ao redor do sítio de penetração do fungo. Veech (1976) utilizou como reagente para a localização das peroxidases, em plantas de algodão infectadas com *Rhizoctonia solani*, o ácido 2-*n*-morfolino etanesulfonico e benzidina saturada-HCl e H_2O_2. Esse autor demonstrou que a atividade da peroxidase era distribuída uniformemente na parede celular e citoplasma. A visualização da peroxidase em endocarpo da fruta de pêssego foi observada por Abeles & Biles (1991), utilizando os substratos guaiacol com H_2O_2, polifenoloxidase com dihidroxifenilalanina e seringaldazina com H_2O_2. A detecção citoquímica das peroxidases nos limites de paredes celulares em folhas de feijão infectadas com *Uromyces vicia-fabae*, foi efetuada utilizando-se como substrato para a localização da atividade, a 3,3'-diaminobenzidina (Bonatti et al., 1994).

2.4.1.6 Papel de peroxidases na patogênese

Segundo Vance et al. (1980) e Hammerschmidt & Kuć (1982), as peroxidases parecem ter um papel nas reações de defesa das plantas, porque a lignificação e o espessamento da parede celular são respostas bem conhecidas no ataque de patógenos, e essas enzimas também podem ser responsáveis pelo último passo na união oxidativa de monômeros fenólicos na formação dos polímeros da parede. Além disso, parecem ter um papel na indução de resistência (Mohan & Kolattukudy, 1990), atuando como um mecanismo de defesa de plantas contra patógenos (Kerby & Somerville, 1992).

Mudanças na atividade das peroxidases têm sido freqüentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas: tomate - *Verticillium dahliae* (Reuveni & Ferreira, 1985), feijão - PMV ("peanut motle vírus") (Wagih, 1993), algodão - *Rhizoctonia solani* (Veech, 1976), rosa - *Botrytis*

cinerea (Shaul & Elad, 1995), tomate - *Pseudomonas syringae* (Bashan et al., 1987), batata - *Erwinia carotovora* (Lojkowska & Holubowska, 1992), trigo - *Erysiphe graminis* (Patykowski et al., 1988), alface - *Bremia lactucae* (Reuveni et al., 1991), melão - *Sphaerotheca fuliginea* (Reuveni & Bothma, 1985), fumo - *Peronospora tabacina*/ TMV (Ye et al., 1990).

Por outro lado, as peroxidases também tem sido investigadas como possíveis marcadores para resistência (Fehrmann & Dimond, 1967; Seevers et al., 1971). Reuveni et al. (1990) demonstraram um rápido ensaio para monitoramento da atividade da peroxidase em melão, como um marcador para resistência a *Pseudoperonospora cubensis*. Os autores verificaram que plantas com alta atividade da peroxidase foram também altamente resistentes à *P. cubensis*. Por sua vez plantas apresentando baixo nível de peroxidase foram suscetíveis ao fungo.

Correlações similares também foram verificadas por Reuveni et al. (1991), onde seis cultivares de alface (*Lactuca sativa*) foram testados, sendo que alguns deles apresentaram alto nível de atividade da peroxidase previamente à infecção com *Bremia lactucae*, causador do oídio. Os autores detectaram alta atividade da peroxidase nos cultivares "Iceberg" e "Santa Anna" (cultivares com alto nível de resistência) e nível intermediário de atividade nos cultivares "Grand Rapids" e Lobjoits Cos" (cultivares com níveis moderados de resistência). Por sua vez, nos cultivares "Cobham Green" (cultivar suscetível) e "Ithaca" (cultivar altamente suscetível) a atividade da peroxidase foi baixa.

Shimoni et al. (1991) observaram a atividade de peroxidases em folhas de milho exibindo suscetibilidade diferencial à *Exserohilum turcicum* nos diversos genótipos. Apesar de seus dados revelarem altos níveis da enzima em plantas resistentes antes da inoculação, em comparação às plantas suscetíveis, isso não foi suficiente para determinar resistência ou suscetibilidade ao fungo. Após a inoculação, a atividade da peroxidase aumentou tanto em plantas resistentes como em suscetíveis. Usando eletroforese em gel de poliacrilamida, os autores verificaram diferentes padrões de isoperoxidases em ambos os materiais. Os resultados obtidos estão de acordo com Kuć & Pressig (1984), onde os autores enfatizam que a rapidez e magnitude com que a ativação dos mecanismos de defesa acontecem, podem ser críticos para a expressão de resistência.

A formação de papilas é considerada como uma resposta geral da planta à invasão fúngica tanto por patógenos como não patógenos. As papilas são compostas principalmente de lignina, calose, proteína, suberina, goma, fenóis e quitina, sendo que a presença de peroxidase nessas estruturas em milho, sugerem que a enzima seja um componente importante para o desenvolvimento estrutural das papilas (Cadena- Gomez & Nicholson, 1987). Os autores demonstraram que plantas de milho inoculadas com *Helminthosporium maydis* e *Colletotrichum graminicola*, formaram papilas em resposta aos fungos, e mudanças nas isoenzimas de peroxidase foram encontradas durante a formação das mesmas. Segundo Oliveira et al. (1997), hipocótilos de *Mimosa scabrella* inoculados com o não patógeno *C. graminicola* apresentaram intensa formação de papilas nos sitios de infecção. A formação das referidas estruturas foi correlacionada com um aumento na atividade de peroxidase.

Aumentos na atividade da peroxidase segundo Reimers et al. (1991), foi observado após a infiltração de cultivares de arroz contendo o gene Xa-10 para resistência a raça de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae,* contendo o gene avr Xa-10. Este aumento foi acompanhado pelo declínio no número de bactérias e um acúmulo de lignina no sítio de infecção, bem como a morte das células hospedeiras. O autor sugere que a resistência no arroz pode parcialmente resultar do acúmulo de compostos tóxicos produzidos durante a atividade da peroxidase na polimerização da lignina.

2.4.2 Proteínas relacionadas à patogênese

As plantas desenvolveram uma complexa variedade de respostas de defesa contra patógenos. Dentre elas, a síntese de novas proteínas pode ter ação direta ou indireta no curso da patogênese, sendo uma resposta onipresente de plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas ao ataque do patógeno (Lamb, et al., 1989; Bowles, 1990). Estas proteínas induzidas incluem proteínas da parede celular, enzimas envolvidas no metabolismo de fenilpropanóides e flavonóides, proteínas tóxicas (tioninas), proteínas com propriedades anti-viral (inibidores enzimáticos), enzimas líticas, e um grupo

heterogêneo de proteínas conhecidas como "Proteínas relacionadas à patogênese" (proteínas-RP).

A síntese da proteínas-RP pode ser induzida não somente pela infecção com patógenos e tratamento com elicitores derivados de patógenos, mas também pela exposição dos tecidos da planta ou cultura de células a vários compostos químicos orgânicos ou inorgânicos. Entretanto, as proteínas-RP podem ser formadas sob condições normais, durante certos estágios de desenvolvimento, como florescimento ou senescência da folhas (Van Loon, 1985).

Segundo Stintizi et al. (1993), as proteínas-RP exibem propriedades fisico-químicas típicas, que as distinguem das demais proteínas encontradas em plantas:

- São estáveis em pH baixo, em torno de 2,8 (quase a totalidade das demais proteínas precipitam nesta condição);
- Mostram-se resistentes à ação de enzimas proteolíticas;
- Geralmente, mostram-se como monômeros, com massa molecular variando de 8 a 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 estão divididas em cinco grupos. Dois deles codificam as enzimas hidrolíticas quitinase e β-1,3-glucanase, as quais podem degradar paredes celulares de fungos e bactérias (Malamy & Klessig, 1992). Essas proteínas-RP foram detectadas pela primeira vez no início da década de 70 em folhas de fumo Samsum NN exibindo reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico (Van Loon & Van Kammenen, 1970). A separação das proteínas-RP em grupos está baseada em características serológicas, de massa molecular e composição de aminoácidos (Carr & Klessig, 1990; Stintizi et al., 1993; Vigers et al.,1991):

Grupo 1- Compreende as formas ácidas RP-1a, - 1b e 1c e a forma básica RP 1g;

Grupo 2- Compreende as β-1,3-glucanases;

Grupo 3- Compreende as quitinases;

Grupo 4- Compreende as proteínas r1, r2 e s2 isoladas de folhas de fumo infectadas com TMV;

Grupo 5- Compreende dois componentes quase neutros, extracelulares, de massa molecular 24 kDa encontrados em vacúolos de células de fumo, em resposta a estresse osmótico (osmotina e *n*-osmotina).

2.4.2.1 Quitinases e β-1,3-glucanases

Como visto acima, várias proteínas relacionadas à patogênese tem sido identificadas como β- 1,3- glucanases e quitinases (Kauffman et al.,1987; Legrand et al., 1987). Essas enzimas são encontradas em muitas plantas e culturas de células após tratamento com patógenos microbianos, elicitores ou agentes químicos (por ex. cloreto de mercúrio, etileno) (Boller, 1985; Vögeli et al., 1988).

As quitinases e β-1,3-glucanases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de N-acetilglicosamina) e as β-1,3- glucanas, respectivamente. Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas (flores, folhas raízes) e podem estar envolvidas na defesa das mesmas contra fungos, uma vez que os polímeros acima, mostram-se como os principais constituintes da parede celular fúngica (Pascholati & Leite, 1995).

Deste modo a implicação dessas duas enzimas na resistência das plantas à doenças foi suportada pela demonstração que elas possuem atividade antifúngica, inibindo o crescimento de vários fungos pela degradação das paredes celulares. As hidrolases podem agir de diferentes maneiras contra os patógenos em potencial. Primeiramente, elas podem digerir a parede celular e lisar as células do patógeno invasor. Segundo, enzimas hidrolíticas podem contribuir para o reconhecimento do patógeno por liberação de substâncias da parede celular dos invasores, que podem agir como elicitores de reações de defesa. Terceiro, as hidrolases podem especificamente atuar sobre uma estrutura vital de um patógeno (Boller, 1987).

As β-1,3- glucanases podem liberar fragmentos de oligossacarídeos a partir da parede celular de *P. megasperma* f. sp. *glycinea*, que agem como elicitores da

produção de fitoalexinas em soja (Keen & Yoshikawa, 1983a,b; Ham et al.,1991). Estas enzimas podem exibir formas ácidas e básicas, sendo que as formas básicas ocorrem de modo geral, intracelularmente (nos vacúolos) e as ácidas, extracelularmente (nos espaços intercelulares). Vários trabalhos indicam que as formas extracelulares possuem uma função imediata na defesa das plantas, com ação direta sobre as hifas invasoras (ação fungicida). As formas intracelulares parecem atuar tardiamente nas reações de defesa das plantas (Pascholati & Leite, 1995). Estas enzimas são também secretadas no interior dos espaços intercelulares durante a reação de hipersensibilidade de algumas plantas à uma variedade de patógenos, sugerindo mais uma vez seu envolvimento na defesa das plantas (Van Loon, 1985; Bol & Van Kan, 1988). As quitinases podem igualmente ser constitutivas ou induzidas em monocotiledôneas e dicotiledôneas após infecção por diferentes vírus, bactérias e fungos de plantas (Oswald et al., 1993). Portanto quitinases e β-1,3-glucanases muitas vezes ocorrem um complicado padrão de isoformas, diferindo nas propriedades físicas, atividade enzimática, antigenicidade, compartimentalização celular, localização no tecido e atividade antifúngica (Boller, 1993; Collinge et al., 1993).

Em plantas sadias, β-1,3-glucanases participam em vários processos fisiológicos, entre eles a autólise (Bucheli et al.,1987) e remoção de calose do floema (Abeles & Forrence, 1970). Porém, a função das quitinases em plantas sadias ainda não está entendida.

As enzimas β-1,3-glucanases podem ser usadas como marcadores bioquímicos, utilizando-se de métodos como eletroforese em gel de poliacrilamida ou focalização isoelétrica (Pan et al., 1989) e correlações positivas ou negativas entre a atividade de β-1,3-glucanases e resistência tem sido demonstrado nas interações melão-*Fusarium oxysporum* (Netzer et al, 1979) e tomate-*Verticillium albo-atrum* (Young & Pegg, 1981) respectivamente. Em vagem de ervilha, entretanto não houve diferença no tempo de aparecimento ou nível de indução de β-1,3-glucanase, após a incubação com raças compatíveis de *Fusarium solani* (Mauch et al.,1988).

Finalmente marcadores bioquímicos, os quais podem ou não ser parte do mecanismo de resistência, são práticos e seguros instrumentos para se predizer resistência

às doenças. A possibilidade do uso das enzimas peroxidase, quitinase e β-1,3-glucanase como marcadores específicos para resistência e subsequentemente na manipulação genética e molecular, está sendo investigada em vários laboratórios (Reuveni, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no "Laboratório de Fisiologia do Parasitismo" e casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, em Piracicaba, SP.

3.1 Material vegetal utilizado nos ensaios

Foram utilizadas sementes de milho pipoca (*Z. mays*) cultivar "South America Mushroon" (Sementes Selecionadas AD Ltda), milho AGX-7393 (Agroceres), milho híbrido XL510 (Braskalb Agropecuária Brasileira Ltda) e sementes de sorgo *(Sorghum bicolor*) cultivar Brandes (CNMS/EMBRAPA de Sete Lagoas – MG).

3.1.1 Obtenção das plântulas de milho e sorgo

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento. Cada parcela foi constituída de 1 vaso de alumínio de 1,5 litros de volume, com solo previamente esterilizado e 4 plântulas por vaso (sorgo ou milho). As sementes foram previamente embebidas e aeradas em água por 6 horas. Após a semeadura, os vasos foram mantidos em condições de casa-de-vegetação por 25-30 dias, ou seja até as plantas atingirem o estádio de 7ª folha verdadeira (Figura 1).

3.1.2 Obtenção de mesocótilos estiolados de milho e sorgo

Sementes de milho e sorgo, foram embebidas e aeradas em água por 6 horas, a temperatura ambiente. Em seguida as sementes foram incubadas entre camadas de papel

de filtro umedecidas, e mantidas no escuro a 28° C. Depois de 5 dias, as plântulas foram expostas a 4 horas de luz para paralisação da elongação dos mesocótilos (Figura 2).

3.2 Preparações das células de levedura

3.2.1 Obtenção de células de *S. cerevisiae*

Para a obtenção das suspensões de células de levedura foi utilizado o "Fermento Biológico Fresco Fleischmann " (FBF) (Fleischmann Royal Jundiaí - SP), o qual foi diluído em água destilada estéril na concentração de 25 mg/mL (Lopez, 1991; Piccinin, 1995). Além disso, foram obtidas culturas puras de *S. cerevisiae* através da repicagem do FBF para placas contendo meio de BDA (batata-dextrose-ágar), as quais foram mantidas sob luz constante e temperatura ambiente. Após 2 dias de incubação, as leveduras foram repicadas novamente para as placas contendo meio BDA e mantidas sob as condições descritas. Seguindo a repicagem, após 2-3 dias, a superfície das placas foi recoberta com água destilada estéril (10 mL), e em seguida raspada com alça de vidro, obtendo-se assim as suspensões de células (S), cujo número de células foi determinado em hematocitômetro ao microscópio óptico e ajustado para $1x\ 10^{8}$ céls/mL Estas suspensões de células (comercial ou cultivadas em BDA) foram autoclavadas (SA) ou não autolcavadas a 120° C/20 min a 1 atm.

3.2.2 Obtenção de filtrados de células de *S. cerevisiae*

Os filtrados das suspensões de células de levedura (comercial ou cultivadas em BDA), autoclavados (FA) ou não autoclavados (F), foram obtidos através da filtragem em conjunto Millipore, utilizando-se inicialmente um pré-filtro (500 μM), seguido por membrana Millipore (0,45 μM). As suspensões de células de levedura autoclavadas, foram também filtradas conforme descrito acima, sendo denominada filtrado de suspensão

autoclavada (FSA). Todas estas preparações foram usadas nos tratamentos, envolvendo os mesocótilos ou plântulas de milho e sorgo.

3.2.3 Perfil espectrofotométrico de filtrados de células de levedura autoclavados e não autoclavados

Uma amostra obtida a partir de filtrado de suspensão de células de *S. cerevisiae* autoclavados (FA) ou não (F), tiveram a absorbância determinada no intervalo entre 200-700 nm, usando-se cubeta de quartzo, tendo água destilada como referência.

3.3 Obtenção do lavado de placas contendo meio de cultura

Placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) foram lavadas com água destilada estéril para a obtenção da preparação denominada lavado de BDA (L-BDA).

3.4 Inoculação e obtenção das amostras de tecidos

As plântulas e mesocótilos foram transferidos para câmara de crescimento, com temperatura de 28° C, fotoperíodo de 10 horas de escuro e 14 horas de luz, sob umidade relativa alta após aspersão com atomizador manual. Diversas preparações de *S. cerevisiae* comercial e mantidas em meio BDA foram aplicadas, sendo que as plântulas ou mesocótilos controle foram aspergidos com água destilada estéril (A).

As amostras foram retiradas, das plântulas de milho e sorgo, durante diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48, 72 e 96 horas), após o tratamento com as preparações de células de levedura. No caso das plântulas, cada amostra constituiu-se de 0,4 g de tecido retirados da 7ª folha verdadeira, na porção mediana da mesma folha. Os tecidos foram cortados com tesoura em pedaços menores, procedendo-se a pesagem dos mesmos e armazenagem em papel alumínio no congelador ou previamente mergulhados em nitrogênio liquido e depois congelados, para posterior uso nos experimentos. Por sua vez, cada amostra de mesocótilos, constituiu-se de 0,15 ou 0,3 g de tecido de sorgo ou

milho, respectivamente, retirados da porção imediatamente abaixo da coleoptile. As amostras foram pesadas e armazenadas conforme descrito anteriormente.

3.5 Determinação da atividade de peroxidases

3.5.1 Obtenção da fonte enzimática

Foram utilizadas amostras do tecido fresco de folhas e mesocótilos de milho e sorgo, obtidas conforme descrito em 3.4. As amostras foram coletadas 0 h e 48 h após a aspersão das preparações leveduriformes. Utilizando-se o método descrito por Cadena-Gomez & Nicholson (1987), com algumas modificações, as amostras de tecido foram homogeneizadas em 10 mLde tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) em aparelho Sorwall - Omni-mixer (1 min à velocidade máxima). O homogeneizado foi filtrado em papel de filtro comum e em seguida, o filtrado foi centrifugado à 20.000 *g* por 25 min, 4° C em centrífuga refrigerada Sorwall RC5 C. O sobrenadante foi coletado com pipeta Pasteur, e este foi considerado o extrato enzimático. Durante as análises, o extrato enzimático foi mantido em banho de gelo, para posterior determinação da atividade da peroxidase e conteúdo proteico.

3.5.2 Atividade de peroxidases

A atividade da peroxidase foi determinada à 30° C através de método espectrofotometrico direto (Hammerschmidt et al., 1982). A mistura da reação consistiu em 2,9 mL de uma solução contendo guaiacol, peróxido de hidrogênio e tampão fosfato de sódio (250 μL guaiacol comercial + 306 μL peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato de sódio) e 100 μL do extrato enzimático. A reação foi seguida por 5 min em espectrofotômetro (Hitachi U 2000) a 470 nm. Os resultados foram expressos em Δ unidades de absorbância/ min/ mg proteína.

3.5.3 Determinação da atividade de peroxidases em *S. cerevisiae*

Amostras de 5 mL de suspensão de leveduras (25 mg/mL) em água destilada estéril, foram mantidas em condições de laboratório à temperatura ambiente e coletadas durante diferentes intervalos de tempo (0 e 24 h). No momento da coleta, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A seguir, procedeu-se a homogeneização das células em aparelho Sorwall - Omni mix (1 min na velocidade máxima) em banho de gelo. O homogeneizado foi levado à centrífuga por 25 min, a 20.000 *g* e temperatura de 4° C. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur, e este foi considerado o extrato enzimático de células homogeneizadas. O sobrenadante de células intactas foi obtido, colocando-se 5 mL de suspensão de células de levedura (25 mg/mL) em tubo de ensaio contendo 5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e levados à centrifugação por 25 min a 20.000 *g* a 4° C. Ambos os extratos de células homogeneizadas e células intactas foram mantidos em banho de gelo, para posterior análise da atividade enzimática e determinação do conteúdo total de proteínas.

3.6 Caracterização isoenzimática de peroxidases

Amostras de tecido de milho e sorgo, foram coletadas 0 h e 48 h após tratamento com preparações de *S. cerevisiae*, e foram submetidas ao mesmo processo de extração das peroxidases descrito em 3.5. Os sobrenadantes foram colocados no interior de sacos de diálise (limite de exclusão molecular 12.000-16.000 daltons) e concentrados a 4° C com polietilenoglicol 20.000. Após 4-6 horas, os resíduos no interior dos sacos de diálise foram ressuspensos em 1 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). As amostras tiveram a concentração proteica ajustada pelo método de Bradford (1976), tomando-se por base a amostra que apresentava menor quantidade de proteínas (faixa de 3,0 a 5,0 μg prot/ 0,8 mL), e então submetidos a eletroforese nativa.

A eletroforese anódica em gel de poliacrilamida foi conduzida utilizando-se o equipamento de eletroforese vertical da Bio-Rad (mini Protean II- Electrophoresis cell). 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 completada a 1 litro com água destilada) e azul de bromofenol a 0,25 %, como corante de corrida. Após a aplicação das amostras, a placa foi mantida a 4° C sob voltagem constante de 80 V até o final da corrida A corrida eletroforética foi interrompida quando o corante atingiu a porção final do gel.

Para a visualização das bandas de peroxidase, o gel foi imerso por 30 min em 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), mais 250 µL de guaiacol e 306 µL de peróxido de hidrogênio, segundo metodologia modificada de Lusso (1989). Após a coloração, o gel foi fixado em ácido acético 7 % por 15 min e armazenado em água destilada. Após a coloração das bandas, os géis foram fotografados e analisados em densitômetro (Eletroforese Z- 30 Turbo Zênite) a 405 nm, para se identificar as bandas que representavam as isoenzimas.

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

3.7.1 Obtenção da fonte enzimática

As amostras de tecido foliar de milho (aproximadamente 0,4 g de peso fresco), foram homogeneizadas mecânicamente em almofariz de porcelana, previamente mantidas em congelador em presença de 6 mL de tampão de extração (tampão acetato/ ácido acético 30mM); (pH 4,0) e 1% de polivinilpirrolidona (PVP), mantidos à temperatura de 4° C. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000g, 25 min a 4° C, sendo o sobrenadante utilizado para se avaliar a atividade enzimática e o teor de proteínas.

3.7.2 Atividades de quitinases e β-1,3-glucanases

A atividade da quitinase foi avaliada através da liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada, marcada com remazol brilhante violeta ("CM-chitin RBV") (Wirth & Wolf, 1990). Para tanto 600 µL de extrato proteico foram misturados

com 200 μL de "CM-Chitin- RBV" (2,0 mg/mL). Após a incubação por 30 min a 40° C, a reação foi paralisada com a adição de 200 μL HCl 2,0 M, e as amostras mantidas em banho de gelo por 10 min, seguida da centrifugação por 5 min a 10.000 *g*.

A absorbância a 550 nm do sobrenadante foi determinada contra tampão de extração na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidades de absorbância/min/mg proteína.

A atividade da β-1,3-glucanase nas amostras foi determinada pela quantificação colorimétrica da glicose liberada da laminarina, através do uso da hidrazida do ácido ρ-hydroxibenzóico (HAPHB) (Lever, 1972). A mistura da reação incubada a 40° C por 90 min, continha 250 μL de extrato enzimático e 250 μL de laminarina (Sigma-obtida de *Laminaria digitata* aprox. 95%; 4,0 mg/mL) (Abeles & Forrence, 1970). Após esse período, foram acrescentados 1,5 mL de uma solução de HAPHB (1,0 g dissolvido em 20 mL de HCl 0,5 M, acrescido de 80 mL de NaOH 0,5 M), sendo em seguida essa mistura aquecida a 100° C por 5 min. Após o resfriamento em gelo até a temperatura de 30° C, as amostras tiveram a absorbância determinada a 410 nm, contra branco (500 μL tampão de extração + HAPHB aquecidos a 100° C por 5 min). Subtraiu-se de cada amostra o valor do controle (correspondente a uma mistura idêntica à da amostra, porém sem incubação prévia). As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para glicose e os resultados foram expressos em μg de glicose/min/mg proteína.

3.7.3 Determinação da atividade de quitinases e β-1,3-glucanases em *S. cerevisiae*

Para a determinação da atividade de quitinase e β-1,3-glucanase em células de *S. cerevisiae* (25 mg/mL) as mesmas foram homogeneizadas ou não em almofariz de porcelana previamente mantidas em congelador, em presença de 6 mL de tampão de extração mais 2% de PVP. O homogeneizado ou suspensão de células foram mantidos em banho de gelo e após a centrifugação a 20.000 *g* por 25 minutos à 4° C, o sobrenadante foi retirado e filtrado através de membrana Millipore com poros de 0,45 μM. O extrato enzimático obtido de células homogeneizadas foi denominado de CH, sendo o extrato

obtido de suspensão de células intactas denominado de CI. Ambos os extratos foram utilizados para se avaliar a atividade enzimática e o teor de proteínas.

3.8 Determinação do conteúdo total de proteínas

Foi utilizado para a quantificação do conteúdo de proteínas o método de Bradford (1976). Para tanto foram adicionados a cada 0,8 mL de amostra 0,2 mL de reagente de Bradford concentrado (Comassie brilhante blue G-250 - 500 mg; álcool etílico 95% - 250 mL; ácido fosfórico 85% - 500 mL). Após a agitação dos tubos de ensaio contendo a amostra e o reagente, estes foram deixados à temperatura ambiente, e após 5 minutos foi efetuada leitura de absorbância a 595 nm. A concentração de proteínas em 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 concentração de ASB variando de 0 a 25 μg/ 0,8 mL.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de tecido vegetal, obtidas conforme descrito em 3.4, foram coletadas 6 horas após a aspersão com a levedura, fixadas em FAA (formalina: ácido acético: etanol 50°; 5:5:90; v/v/v) durante 48 horas e transferidas para etanol 60° e 70°. As mesmas 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 desidratado em aparelho para secagem ao ponto crítico (Balzers CPD 030) com CO_2, montado em "stubs" com fita de carbono dupla face e metalizados com ouro em evaporador (MED 010 Balzers Union) durante 150 s. A observação das amostras foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (DMS 940 Zeiss), sob aceleração de 10kV.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade enzimática em extratos obtidos de tecidos de milho e sorgo tratados com *S. cerevisiae*

A atividade da peroxidase em extratos de mesocótilos de milho tratados com *S. cerevisiae* proveniente da preparação comercial, foi maior em relação ao controle, nos diversos tempos, sendo a maior atividade expressa 24 horas após o tratamento (Figura 3A). Por sua vez, mesocótilos aspergidos com preparações de *S. cerevisiae* mantidas em BDA, exibiram maior atividade da peroxidase nos tratamentos envolvendo suspensão (S), suspensão autoclavada (SA) e filtrado de suspensão autoclavada (FSA) 72 horas após o início do experimento (Figura 3B).

A análise estatística, efetuada através do teste de Tukey, revelou haver diferença significativa no tratamento filtrado de suspensão autoclavada (levedura comercial) no período de 24 horas, em relação ao controle ao nível de 5% (Figura 3A). Por sua vez, mesocótilos tratados com levedura crescida em BDA diferiram significantemente ao nível de 5% em relação ao controle, com base no tratamento filtrado de suspensão autoclavada (72 horas) (Figura 3B).

Quando folhas de milho foram aspergidas com preparações de *S. cerevisiae* comercial, esses tecidos exibiram maior atividade da peroxidase 48 e 72 horas após o tratamento com suspensão (S) e filtrado de suspensão autoclavada (FSA) (Figura 4), onde obsevou-se diferença significativa ao nível de 5% em relação aos demais tratamentos.

Folhas de milho tratadas com preparações da levedura comercial, exibiram maior atividade da quitinase em resposta a todos os tratamentos nos diversos tempos, sendo que a maior atividade observada ocorreu 72 e 96 horas após os tratamentos em

relação ao controle (Figura 5), porém não foram observadas diferenças significativas ao nível de 5% em relação ao controle. Por sua vez, a atividade de β-1,3-glucanase foi maior 48 e 72 horas após os tratamentos com suspensão autoclavada (SA) e filtrado de suspensão autoclavada (FSA) em relação ao controle (Figura 6). Esse aumento foi mais acentuado no período de 72 horas, diferindo significantemente ao nível de 5% em relação aos demais tratamentos.

Mesocótilos de sorgo aspergidos com preparações de *S. cerevisiae* mantidas em BDA exibiram maior atividade da peroxidase 72 horas após o tratamento com suspensão (S) (Figura 7), onde observou-se a diferença significativa de 5% em relação ao controle.

Folhas de sorgo tratadas com levedura comercial, exibiram maior atividade da peroxidase em todos os tratamentos e intervalos de tempos, em relação ao controle (Figura 8). A análise estatística revelou haver diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao controle, ao nível de 5% .

Quando as folhas de sorgo foram tratadas com *S. cerevisiae* mantidas em BDA, ocorreu um aumento acentuado na atividade da enzima em todos os tratamentos após 48 horas (Figura 9), onde diferiram significantemente ao nível de 5% em relação ao controle.

Os mesocótilos de milho e sorgo tratados com lavado da placa contendo meio BDA (L-BDA), exibiram atividade de peroxidase semelhante ao controle em todos os tempos (Figura 15). A análise estatística efetuada não revelou haver diferenças significativas entre os tratamentos nos tecidos de milho nos diversos tempos, porém 72 horas após aspersão com suspensão de levedura (S) nos tecidos de sorgo, foi observada diferença significativa ao nível de 5% em relação aos demais tratamentos.

Amostras de tecido de milho e sorgo coletadas 48 horas após os tratamentos com as diversas preparações de *S. cerevisiae* (comercial), foram mergulhadas previamente em nitrogênio líquido e armazenadas em congelador ou apenas congeladas, exibiram resultados semelhantes quanto a atividade da peroxidase. Mesocótilos de milho (A) sorgo (B) (Figura 16). A análise estatística efetuada não revelou haver diferenças significativas ao nível de 5% entre os métodos de armazenagem, nos tecidos de milho e

sorgo, porém observou-se diferença significativa ao nível de 5% no tratamento suspensão autoclavada (SA) em relação aos demais tratamentos, nos tecidos de sorgo.

4.2 Atividade de peroxidases, quitinases e β-1,3-glucanases em extratos obtidos de células de *S. cerevisiae* intactas ou homogeneizadas

Embora a atividade enzimática das células de *S. cerevisiae* tenha sido bastante baixa, quando comparadas com a atividade da peroxidase em tecidos de milho e sorgo, as células homogeneizadas, produziram um extrato que exibiu maior atividade da enzima em relação a suspensão com células intactas. Após 24 horas, houve uma diminuição da atividade da enzima em amostras obtidas células intactas ou homogeneizadas (Figura 10).

Quanto a análise estatística, obsevou-se diferenças significativas entre os tratamentos, ao nível de 5% em todos os tempos. Os ensaios não evidenciaram a presença de hidrolases nas suspensões de células homogeneizadas ou intactas (dados não mostrados).

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

4.3.1 Tecidos de milho

O padrão isoenzimático de folhas de milho tratadas com preparações de *S. cerevisiae* comercial mostrou a presença de duas novas isoenzimas (2 e 3) em resposta aos tratamentos com suspensão e suspensão autoclavada, respectivamente, porém não foi detectada a isoenzima 1 no tratamento S (Figura 11). Quanto a intensidade de coloração das bandas, aparentemente as isoenzimas 4 com valor de RM 0.14 a 0.15, nos tratamentos S e F, exibiram maior intensidade da coloração em relação aos demais tratamentos

A eletroforese dos extratos obtidos de mesocótilos de milho tratados com preparações levedura comercial evidenciou em relação ao controle, a presença de duas novas isoenzimas (3, 10) no tratamento S, três (1,3 e 6) em SA, uma (1) em FA e duas

(3,6) em FSA (Figura 12). Por sua vez, não foram detectadas duas isoenzimas (4,9) em S, três (4,5 e 9) em SA, uma (9) em F, uma (5) em FA e duas (5,7) em FSA.

4.3.2 Tecidos de sorgo

Amostras de folhas de sorgo tratadas com preparações de levedura comercial, quando submetidas a eletroforese, evidenciaram em relação ao controle, a presença de três novas isoenzimas (1,4 e 6) no tratamento S, quatro (1,4,9 e 10) em SA, três (1,3 e 9) em FA e duas (3,6) em FSA. Por sua vez, não foram detectadas quatro isoenzimas (2,5,7 e 8) em S, três (2,5 e 7) em SA, duas (7,8) em F, duas (5,7) em FA e quatro (2,5,7 e 11) em FSA (Figura 13).

A eletroforese de extratos obtidos de mesocótilos de sorgo tratados com preparação de levedura comercial, evidenciou em relação ao controle, a presença de duas novas isoenzimas (4,9) no tratamento S, duas (3,4) em F, duas (3,9) em FA e três (2,3 e 4) em FSA. Por sua vez, não foram detectadas duas isoenzimas (6,10) em S, duas (6,8) em SA, três (1,6 e 8) em F, três (1,8 e 10) em FA e uma (1) em FSA (Figura 14).

4.4 Perfil espectrofotométrico de filtrados de suspensões de *S. cerevisiae* autoclavadas ou não autolcavadas

Os resultados evidenciaram que filtrados de suspensões de células autoclavadas apresentaram um pico em torno de 260 nm (a) enquanto que filtrado de células não autoclavadas não exibiram esse pico de absorção (b) (Figura 17).

4.5 Microscopia eletrônica de varredura

As fotos constantes na Figura 18, ilustram o padrão de deposição das células de *S. cerevisiae* sobre folhas de milho (A) e sorgo (B), onde observou-se uma maior tendência das células em se depositarem ao longo das depressões nas junções celulares.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostram que as alterações ocorridas na atividade da peroxidase em tecidos de milho e sorgo e atividade de quitinase e β-1,3-glucanase em folhas de milho, quando do tratamento com *S. cerevisiae*, provavelmente deve-se ao fato da planta "reconhecer" a levedura como um organismo estranho, e portanto alterar o metabolismo normal em resposta ao possível invasor. Mudanças na atividade da peroxidase em plantas inoculadas com microrganismos, quando comparadas com plantas controle não inoculadas, tem sido relatadas em várias interações patógeno-hospedeiro (Abbattista et al., 1982; Arora & Bajaj, 1985; Reuveni & Bothma, 1985). Quanto as enzimas quitinase e β-1,3-glucanases, estas são encontradas em muitas plantas e culturas de células após o tratamento com patógenos microbianos, substâncias químicas (Boller, 1985) e etileno (Vögeli et al, 1988).

Diversas hipóteses foram formuladas para explicar o aumento da atividade da peroxidase nas interações plantas-microrganismos (Uritani & Oba, 1979; Van Loon, 1986; Ward, 1986). Entre essas hipóteses pode-se citar o envolvimento da enzima no processo de reparo de tecido danificado pelo patógeno em potencial. Este envolvimento pode ocorrer através da biossíntese de lignina - polímero que pode ser usado no reparo de tecidos danificados (Ward, 1986), visto que a peroxidase faz parte do último passo na oxidação dos álcoois cinâmicos que leva à formação da lignina (Gross, 1979; Harkin & Obst, 1973). Outra hipótese sobre o aumento da atividade da peroxidase envolve o hormônio vegetal etileno (Van Loon, 1986; Ward, 1986), visto que a peroxidase faz parte da via metabólica responsável pela biossíntese desse hormônio, o qual é normalmente produzido em situações de estresse. (Boyer & De Jalgher, 1986). Finalmente, uma terceira hipótese envolveria a descompartimentalização de compostos, tais como fenóis, ácidos

graxos e enzimas oxidativas, que ocorrem devido ao dano causado pelo patógeno ao tecido hospedeiro (Ward, 1986).

Embora algumas hipóteses existam para explicar as alterações da peroxidase nas interações planta-patógeno, pouco é conhecido sobre as alterações da atividade da peroxidase em interações não patógeno-planta, como é o caso da *S. cerevisiae* com plantas de milho e sorgo.

O acúmulo de proteínas-RP tem sido muito estudado, principalmente em fumo e tomate (Cordero et al., 1993). Em contraste a extensiva literatura sobre proteínas-RP em plantas dicotiledôneas, há poucos estudos sobre a indução dessas proteínas em monocotiledôneas. Quitinases e β-1,3-glucanases tem sido purificadas de sementes de trigo, cevada, milho e arroz (Anuratha et al., 1992; Kragh et al., 1991; Molano et al., 1979; Swegle et al, 1992). Anuratha et al. (1996) demonstraram a indução de quitinases e β-1,3-glucanases em plantas de arroz (*Oryzia sativa*), pela infecção com um fungo patogênico (*Rhizoctonia solani*) e injúria. Em milho, várias proteínas-RP tem sido encontradas em folhas após tratamento com cloreto de mercúrio ou infecção com BMV ("Brome Mosaic Virus") (Nasser et al., 1988). Huynh et al. (1992) purificaram e clonaram duas quitinases de sementes de milho com 28 kDa, designadas quitinase A (Chit A) e quitinase B (Chit B), capazes de inibir o crescimento dos fungos patogênicos *Fusarium oxysporum* e *Alternaria solani*, e um não patogênico *Trichoderma reesei*, sendo que a Chit A exibiu maior atividade em relação a Chit B. Portanto, grandes quantidades de quitinases em sementes de milho, pode significar um papel dessa enzima na proteção contra o ataque de patógenos durante a germinação.

5.1 Atividade de peroxidases em extratos obtidos de tecidos de milho e sorgo, e atividade de quitinases e β-1,3-glucanases em folhas de milho, tratados com *S. cerevisiae*

Visto que preparações de *S. cerevisiae* foram utilizadas como elicitores dos mecanismos de resistência em plantas contra fitopatógenos (Reglinsk et al., 1995; Piccinin, 1995; Stangarlin & Pascholati, 1994; Silva & Pascholati, 1992), o presente

trabalho procurou esclarecer se a levedura, possui habilidade em alterar o metabolismo da planta, tendo as enzimas peroxidase, quitinase e β-1,3-glucanase, como marcadores bioquímicos. Na primeira fase do trabalho, procurou-se definir as preparações de células de levedura, que submetidas ou não ao tratamento térmico, poderiam levar à uma maior indução de atividade da peroxidase em tecidos de milho e sorgo, bem como quitinase e β-1,3-glucanase em folhas de milho. De um modo geral, todas as preparações de *S. cerevisiae* utilizadas alteraram a atividade das enzimas em comparação ao controle. Além do que, as preparações obtidas da levedura crescida em BDA quando comparadas as preparações de levedura obtidas do produto comercial, foram semelhantes quanto a alteração da atividade das enzimas peroxidase, quitinase e β-1,3-glucanase.

Através dos resultados obtidos pode-se verificar também que, nem sempre a presença de células vivas de *S. cerevisiae* parece ser necessária para que alterações na atividade enzimática ocorram, uma vez que os filtrados das suspensões também foram efetivos. Além disso, células autoclavadas e filtrados autoclavados continuaram a exibir atividade biológica, demonstrando que os mesmos não são termolábeis. Em contraste aos resultados de Roveratti (1989), na interação folhas de café-*Hemileia vastatrix,* filtrados de células vivas ou autoclavadas da levedura não foram capazes de proteger as folhas de café contra ferrugem. Por sua vez, o tratamento térmico da suspensão de células *S. cerevisiae* não alterou a habilidade da levedura em inibir a germinação dos urediniosporos e o decréscimo da permanência na superfície da folha. Silva & Pascholati (1992) demonstraram que em plantas de milho cultivadas sob condições de casa-de-vegetação e tratadas com preparações de *S. cerevisiae* (comercial ou cultivada em BDA), ocorria uma redução no desenvolvimento de *C. graminicola* e a expressão da antracnose nas folhas. A atividade biológica das diferentes preparações de levedura e seus filtrados mostrou ser termolábel, além do que a presença das células de levedura não foi necessária para proteger as folhas.

Devido a possibilidade das preparações de células de *S. cerevisiae* oriundas do produto comercial, possuirem algum componente do meio aquoso utilizado na multiplicação em dornas de fermentação, procurou-se isolar as células a partir do

"Fermento Biológico Fresco Fleischmann", e mantê-las em meio de BDA, a fim de se demonstrar que as alterações na atividade das enzimas eram devidas a ação das células de levedura e não a algum produto contido no meio de cultivo comercial. Os resultados evidenciaram que, as diversas preparações obtidas de células de *S. cerevisiae*, mantidas em meio BDA, aspergidas sobre tecidos de milho ou sorgo, alteraram a atividade das enzimas, confirmando a capacidade biológica dessas preparações.

Diversos autores têm demonstrado a possibilidade da proteção de plantas contra fitopatógenos pela aplicação de microrganismos, os quais atuam diretamente sobre esses fitopatógenos, através da competição por nutrientes e/ou pela produção de metabólitos tóxicos (Cook & Baker, 1983). Por outro lado, diversos trabalhos também evidenciaram a possibilidade da proteção de plantas contra fitopatógenos, pela aplicação da levedura *S. cerevisiae* (Roveratti, 1989; Silva, 1989; Piccinin, 1995), um não patógeno de plantas. Reglinsk et al. (1994), empregando um elicitor ativo presente em extratos da parede celular de *S. cerevisiae*, demonstraram sua habilidade em reduzir a expressão de oídio em cevada. Quando aplicados em folhas destacadas, o elicitor induziu à um aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia - liase e na formação de papilas, em resposta a tentativa de penetração pelo fungo. Reglinsk et al. (1995) também demonstraram que o controle de *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* em alface podia ser obtido utilizando-se extratos da parede celular da levedura.

5.2 Atividade de peroxidases, quitinases e β-1,3-glucanases em preparações de células de *S. cerevisiae*.

Sendo a peroxidase uma enzima encontrada em microrganismos (Lück, 1965; Kosugue, 1969; Hoagland, 1990), procurou-se avaliar a capacidade da *S. cerevisiae* em exibir atividade de peroxidase. Os ensaios indicaram uma baixa atividade enzimática, em células intactas e células homogeneizadas em um período de 24 horas, indicando que a contribuição da levedura é quase desprezível no aumento da atividade peroxidativa no tecido tratado. Vance et al. (1976) observaram a ausência de atividade significativa de peroxidase em micélio de *Helminthosporium sp.*

Por sua vez, pode-se verificar que as suspensões de *S. cerevisiae* tratadas termicamente ou não e filtrado de suspensão autoclavada, foram efetivos na indução de alterações na atividade das enzimas quitinase e β-1,3-glucanase em folhas de milho. Devido ao fato dessas hidrolases serem encontradas em levedura (Fleet, 1991), procurou-se avaliar a capacidade da *S. cerevisiae* em exibir atividade dessas enzimas. Não se detectou em nossas condições experimentais a produção de β-1,3-glucanases e quitinases por células da levedura, visto que a metodologia utilizada foi padronizada para folhas de milho e não para células de levedura. Portanto a atividade das hidrolases foi de origem da planta e não da *S. cerevisiae*, embora a presença de β-1,3-glucanases por leveduras tenha sido demonstrada, visto que estas enzimas participam de eventos morfogenéticos, assim como brotamento, expansão, conjugação e esporulação, que requerem a hidrólise controlada das paredes (Phaff, 1977). Evidências preliminares sugerem que diferentes glucanases podem ser requeridas em diferentes estágios durante o ciclo de vida da célula. As quitinases estão presentes nas leveduras, onde sua atividade é maior durante o crescimento exponencial, sugerindo um envolvimento no processo de brotamento (Fleet, 1991).

5.3 Isoperoxidases em tecidos de milho e sorgo tratados com *S. cerevisiae*.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que, 48 horas após os tecidos de milho e sorgo serem tratados com preparações de *S. cerevisiae*, ocorre o aparecimento de novas isoperoxidases e o desaparecimento de algumas delas em relação ao controle. Diversos trabalhos, relatam o surgimento de novas isoperoxidases em tecidos vegetais em resposta tanto a inoculação com microrganismos, como em resposta a ferimentos (injúrias) (Cadena-Gomez & Nicholson, 1987; Van Loon, 1986; Ward, 1986).

Farkas & Starmann (1966), trabalhando com tecidos de feijoeiro infectados com "Southern Bean Mosaic Virus" (SBMV), encontraram um incremento no número de isoperoxidases. A separação em gel de poliacrilamida mostrou a existência de duas isoperoxidases em plantas sadias, enquanto que as plantas infectadas exibiam duas novas formas da enzima. Os autores concluíram que o aumento do complexo de peroxidases nas

folhas dos feijoeiros infectados, se devia a dois fatores indiretamente associados à multiplicação do vírus: a aceleração da senescência induzida pelo parasitismo do vírus e aos danos mecânicos e a necrobiose que acompanharam o desenvolvimento da lesão. Os mesmos autores também sugeriram que a formação das novas peroxidases em tecidos infectados era baseada na síntese proteica. Surlí et al. (1981), estudando isoperoxidases em plantas de feijoeiro infectadas com vírus do "Mosaico Comum do Feijão" (BCMV), também chegaram a resultados semelhantes. Comparando o padrão eletroforético de uma variedade resistente com o de uma variedade suscetível, encontraram na primeira um maior número de isoperoxidases, mesmo antes da infecção, e um aumento da atividade das isoperoxidases, após a infecção. O incremento na atividade das isoperoxidases, após a infecção, foi maior nas plantas resistentes do que nas suscetíveis.

Lusso e Pascholati (1997) demonstraram a alteração da atividade e do perfil eletroforético da enzima peroxidase em plantas de milho em resposta a inoculação com *H. maydis* raça 0, *H. carbonum* raça 1 e à injúria mecânica com carburundo. Os autores detectaram 12 horas após os tratamentos, o aparecimento de duas novas isoenzimas, porém não foram detectadas três isoenzimas, além do incremento da atividade enzimática.

5.4 Lavado da placa contendo meio de BDA e comparação entre os métodos de armazenagem

Com base nos resultados ilustrados na Figura 15 pode-se observar que não houve aumento na atividade da enzima peroxidase, quando mesocótilos de milho e sorgo foram tratados com o lavado da placa contendo meio de BDA. Esses resultados demonstraram que somente as células e/ou metabólitos liberados pela levedura no meio BDA foram aptos a causar alterações na atividade enzimática nos tecidos.

De acordo com os resultados obtidos na Figura 16 (A e B), pode-se observar que quando mesocótilos de milho e sorgo foram armazenados diretamente em congelador ou mergulhados previamente em nitrogênio líquido e depois armazenados em congelador, os resultados obtidos para atividade da peroxidase foram semelhantes, demonstrando que a forma de armazenagem não causou estresse ou injúria nos tecidos analisados.

5.5 Comentários finais

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que metabólitos produzidos pelas células de *S. cerevisiae* bem como componentes da parede celular da levedura podem estar agindo como elicitores na alteração da atividade da peroxidase, quitinase e β-1,3-glucanase nos tecidos das gramíneas estudadas. Graham & Graham (1991) demonstraram que uma glucana da parede celular de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* induzia um rápido e massivo acúmulo de compostos fenólicos em células de cotilédones de soja próximo ao ponto de aplicação do carboidrato. Este acúmulo de compostos fenólicos foi acompanhado de rápido e massivo aumento na atividade de um grupo de peroxidases aniônicas, embora o aumento da atividade não tenha sido estritamente limitado para as células imediatamente adjacentes a área do tratamento com o elicitor, e a deposição de polímeros fenólicos tenha ocorrido em menor extensão em células distantes.

Nas preparações em que as suspensões de células de *S. cerevisiae* foram autoclavadas, os filtrados obtidos devem conter substâncias fisiologicamente termoestáveis. Com base na literatura, existe a possibilidade de que este(s) componente(s) seja(m) polissacarídeos como glucanas e mananas, pois estes carboidratos são encontrados em grandes quantidades nas paredes celulares das leveduras.

Segundo Hahn et al. (1992), os fungos possuem oligossacarídeos que estão presentes nas paredes celulares das hifas, os quais induzem várias respostas de defesa das plantas. Esses oligossacarídeos podem ser lineares com ligações β -D-(1→4) e originários da quitosana, atuando como elicitores de fitoalexinas em vagens de ervilha, inibidores de protease em plantas de tomate e da síntese de calose em suspensões de culturas de células de soja. Os oligossacarídeos lineares podem também possuir ligações N-acetil β-D- (1→4) sendo derivados da quitina, e podendo elicitar quitinases em melão e a lignificação em trigo. O elicitor melhor caracterizado e isolado da parede celular de fungos é um hepta glucosideo ramificado com ligações β-D, e derivado de β- glucanas.

Vários estudos relatam a liberação de olissacarídeos ativos da parede de fungos. No trabalho de Ayres et al. (1976a), através do uso de parede celular do fungo

Phytophthora megasperma var. *sojae* (Pms), por meio de extração aquosa à 121°C, os autores conseguiram solubilizar cerca de 5% dos carboidratos presentes na parede. Porém, uma liberação mais eficiente do elicitor ativo foi obtida por hidrólise ácida parcial (Sharp et al., 1984). Continuando com o trabalho envolvendo *P. megasperma* var. *sojae*, Ayres et al. (1976a) demonstraram o acúmulo de fitoalexinas em tecidos de soja (*Glycine max*) por um elicitor extracelular isolado do fungo. Este elicitor foi caracterizado como sendo uma glucana, o qual era similar na composição e estrutura ao polissacarídeo componente de parede micelial de Pms. No mesmo ano, Ayres et al. (1976b) isolaram e purificaram uma preparação elicitora da produção de fitoalexina em soja, a partir das paredes celulares de Pms por tratamento com calor. Foram obtidas quatro frações de três raças de *P. megasperma* var. *sojae ou glycinea*, sendo muito similares na composição e atividade elicitora. Dentre as quatro frações, a fração I era composta principalmente de uma glucana β-1,3 ramificada, similar aos elicitores extracelulares descritos acima. Por sua vez, as frações II e IV eram compostas por mananas altamente ramificadas contendo glicoproteínas, e a fração III continha dois polissacarídeos ligados a proteína. Vários critérios demonstraram ser o elicitor um polissacarídeo, pois a habilidade da atividade do elicitor a extremos de pH, alta temperatura e tratamento com pronase, eliminou a possibilidade deste ser uma proteína.

Hahn & Albersheim (1978) isolaram um elicitor do acúmulo de gliceolina em soja, a partir de extratos da levedura *S. cerevisiae*. As análises estruturais mostraram ser o elicitor uma glucana contendo terminações 3-, 6- e resíduos glicosil com ligações 3,6 e muito similar ao encontrado em paredes celulares de Pms. Este e outros trabalhos citados acima sugerem que as plantas são capazes de responder através da ativação de seus mecanismos de defesa, a presença de um amplo espectro de fungos patogênicos ou não patogênicos, por reconhecer como estranho os polissacarídeos da parede celular dos mesmos. A indução de mecanismos de defesa requer um processo de mútuo reconhecimento entre a planta e o invasor. Assim, o reconhecimento é realizado devido a trocas de sinais químicos, os quais em muitos casos envolve a participação da planta e parede celular do microrganismo (Darvill & Albersheim, 1984).

A análise espectrofotométrica dos filtrados obtidos de suspensões de células de *S. cerevisiae* autoclavadas, indicou a presença de um pico na região de 260 nm, porém o mesmo não ocorreu com filtrados de células não autoclavadas (Figura 17).

Quando as células *de S. cerevisiae* foram colocadas em suspensão aquosa, provavelmente pequenas quantidades de componentes celulares poderiam ter sido solubilizados e passados da célula para a água. Porém, quando suspensões de *S. cerevisiae* foram autoclavadas, provavelmente os polissacarídeos existentes nas paredes celulares, foram extraídos devido à alta temperatura e uma pequena parte desses, tornou-se solúvel. Por sua vez, muitos componentes do interior da célula poderiam ter passado para a suspensão aquosa, restando apenas glicoproteínas e polissacarídeos com atividade biológica por serem termoestáveis. A parede celular da levedura é contituída quase que totalmente de duas classes de polissacarídeos: a) polímeros de glicose - glucanas; b) polímeros de manose ligados covalentemente à peptideos - manoproteínas. Um terceiro açúcar polímero de N-acetilglucosamina, a quitina, é caracteristicamente um dos maiores componentes de paredes fúngicas, mas está presente em menor quantidade nas leveduras (Cabib et al.,1982). A microscopia eletrônica de paredes celulares de *Saccharomyces sp* demonstrou que estas são compostas de duas ou mais camadas, sendo que análises químicas efetuadas mostraram que a parede celular continha cerca de 29% de glucanas, 31% de mananas, 13% de proteínas, 8,5% de lipídeos e 3% de cinzas (Gander, 1974). Segundo Rose (1993), a parede celular de *S. cerevisiae* representa cerca de 15 a 25% do peso seco da célula, sendo que 80- 90% da parede celular é composta de uma mistura de polissacarídeos e o restante representado por proteínas e lipídios. Três glucanas estão presentes na parede celular, sendo que o maior componente é um polímero álcali insolúvel com ligações β (1-3), o qual é responsável pela rigidez da parede. Existe também uma glucana álcali solúvel com ligações predominantemente β (1-3) e algumas ligações β (1-6). Finalmente, as paredes contém uma pequena proporção de glucanas com ligações β (1-6). Uma pequena quantidade de quitina na parede é encontrada associada com glucana álcali insolúvel, estando localizada nas cicatrizes dos brotamentos. Embora aparentemente rígida na estrutura, a parede celular da levedura participa em um número de mudanças

morfológicas, incluindo brotamento, "mating" e esporulação. Os carboidratos localizados na superfície externa da parede celular, determinam as propriedades imunoquímicas da célula da levedura (Kreutzfeldt & Witt, 1991)

Finalmente, com base no presente trabalho pode-se afirmar que as células de *S. cerevisiae* liberam metabólitos do seu interior e/ou da parede celular que podem agir como "sinais" que levam à alteração da atividade da peroxidase em tecidos de milho e sorgo, e quitinase e β-1,3-glucanase em folhas de milho. A natureza química e o modo de ação desses metabólitos necessitam de estudos posteriores.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pôde-se concluir que:

a) Preparações de células da levedura *S. cerevisiae*, obtidas do "Fermento Biológico Fresco Fleischmann" ou mantidas em BDA mostraram-se efetivas na alteração da atividade de peroxidases e padrão isoenzimático em mesocótilos e folhas de milho e sorgo;
b) Preparações das células de *S. cerevisiae* foram efetivas na alteração das atividades de quitinases e β-1,3-glucanases em folhas de milho;
c) A presença de células da levedura parece ser desnecessária para que alterações na atividade enzimática ocorram, uma vez que os filtrados das suspensões também mostraram-se efetivos;
d) A atividade elicitora dos filtrados quanto a alteração enzimática, mostraram-se termoestáveis.

ANEXOS

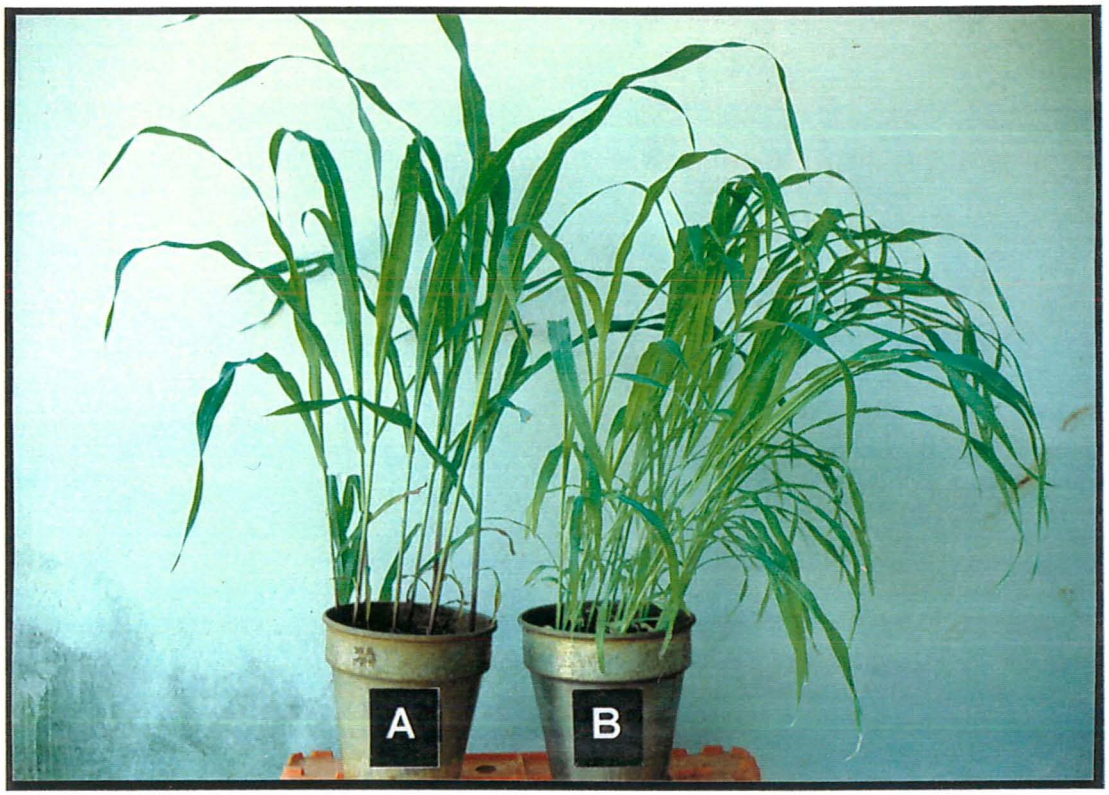


Figura 1. Aspecto das plântulas de milho (A) e sorgo (B) no estádio de 7ª folha verdadeira, mantidas em condições de casa-de-vegetação por 25-30 dias.

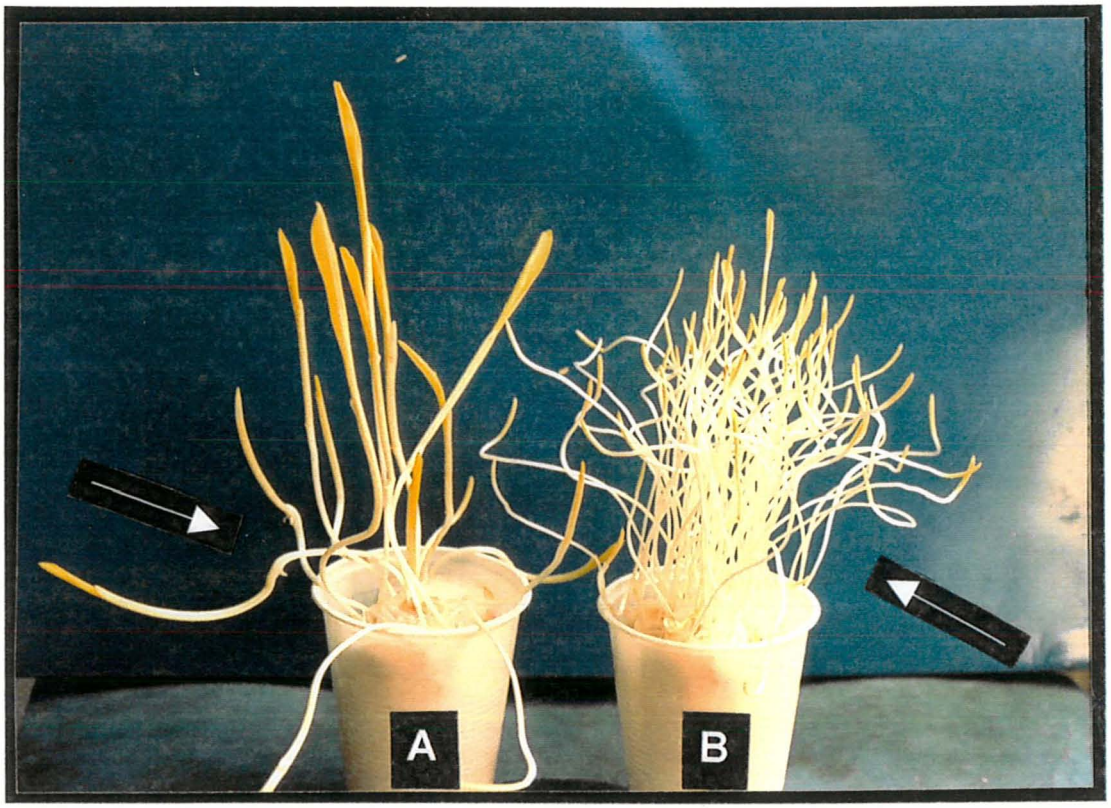


Figura 2. Aspecto das plântulas de milho (A) e sorgo (B) exibindo mesocótilos estiolados (setas), após cinco dias no escuro em câmara de crescimento.

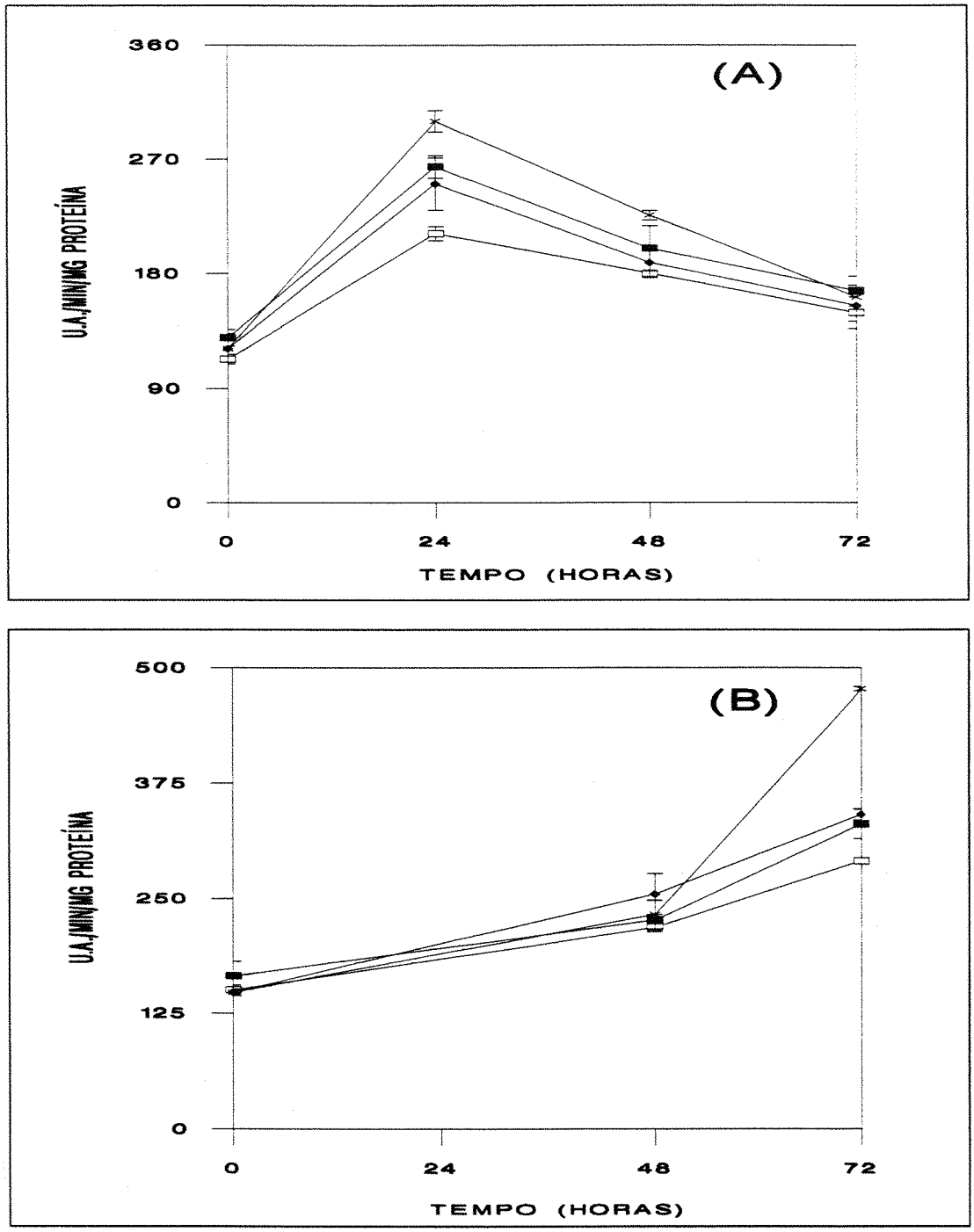


Figura 3. Atividade de peroxidases em extratos de mesocótilos de milho (cv. AGX-7393), coletados até 72 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ água, ■ suspensão; ◆ suspensão autoclavada; X filtrado de suspensão autoclavada. A) Preparação comercial de *S. cerevisiae*; B) levedura mantida em meio BDA.

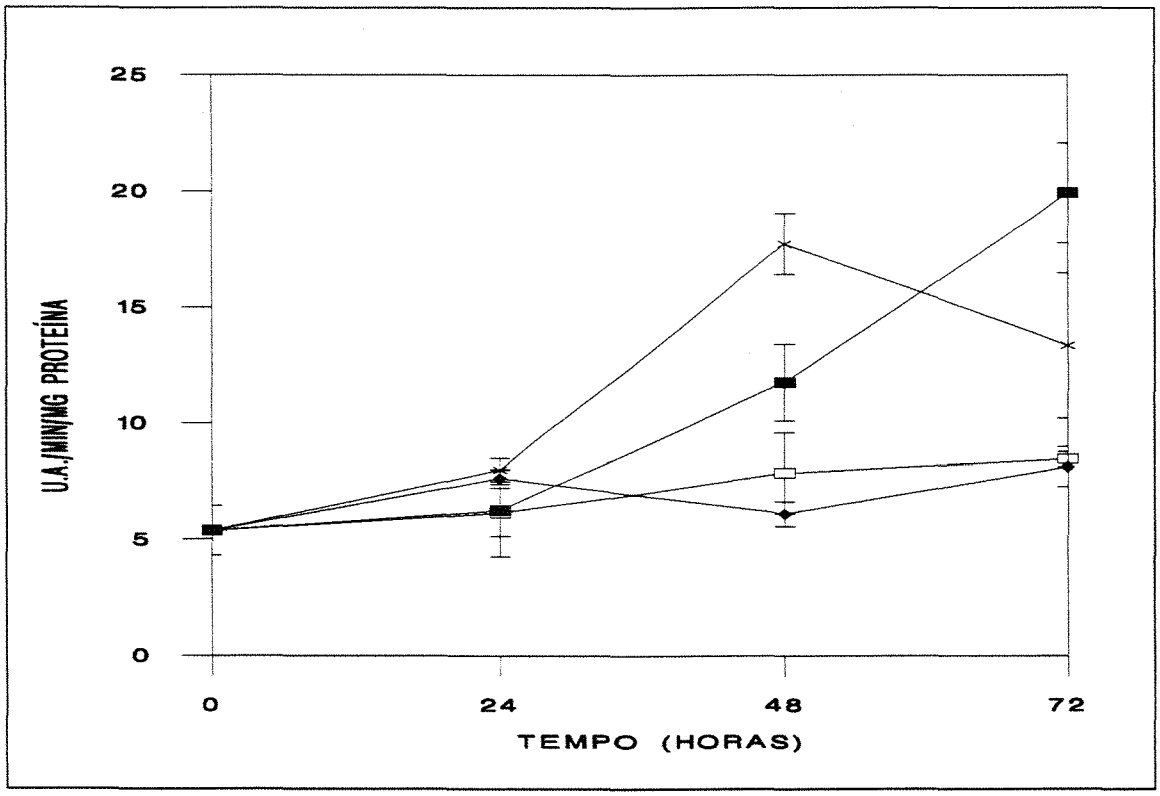


Figura 4. Atividade de peroxidases em extratos de folhas de milho (cv. AGX-7393), coletados até 72 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ água; ■ suspensão; ◆ suspensão autoclavada; × filtrado de suspensão autoclavada.

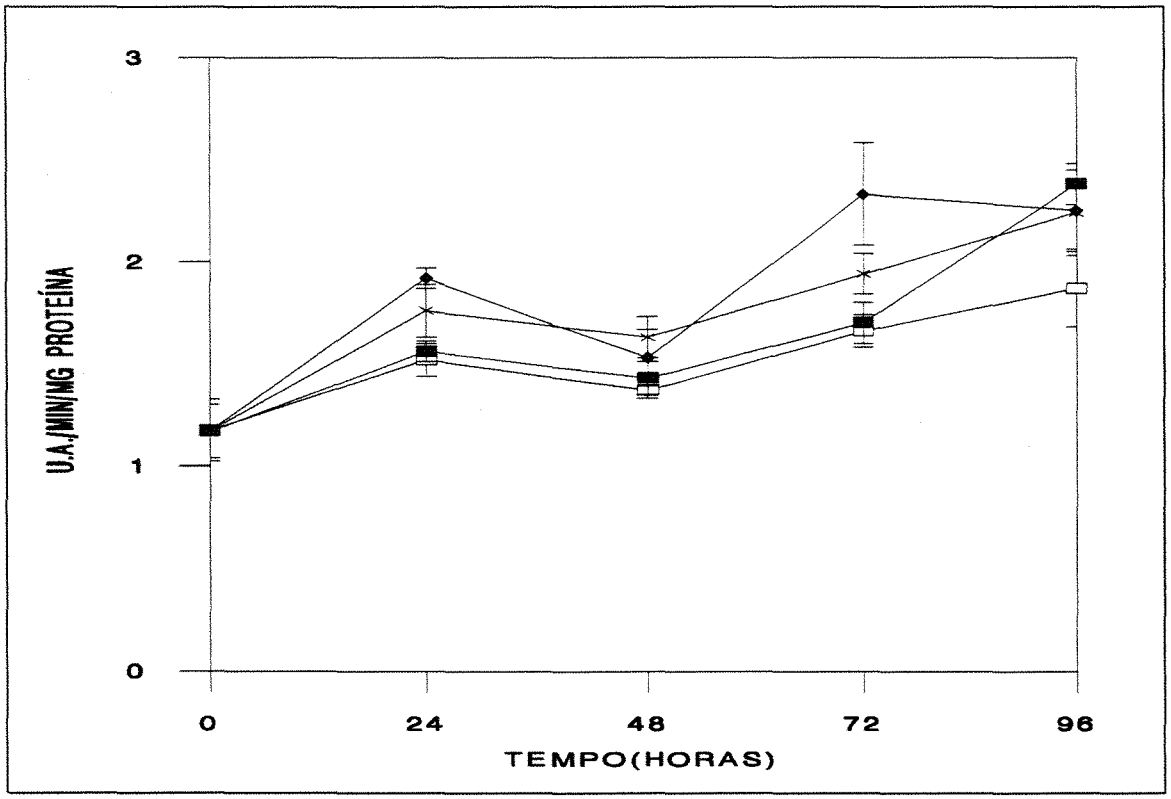


Figura 5. Atividade de quitinases em extratos obtidos de folhas de milho (cv. XL510), coletadas até 96 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ água; ■ suspensão; ◆ suspensão autoclavada; X filtrado de suspensão autoclavada.

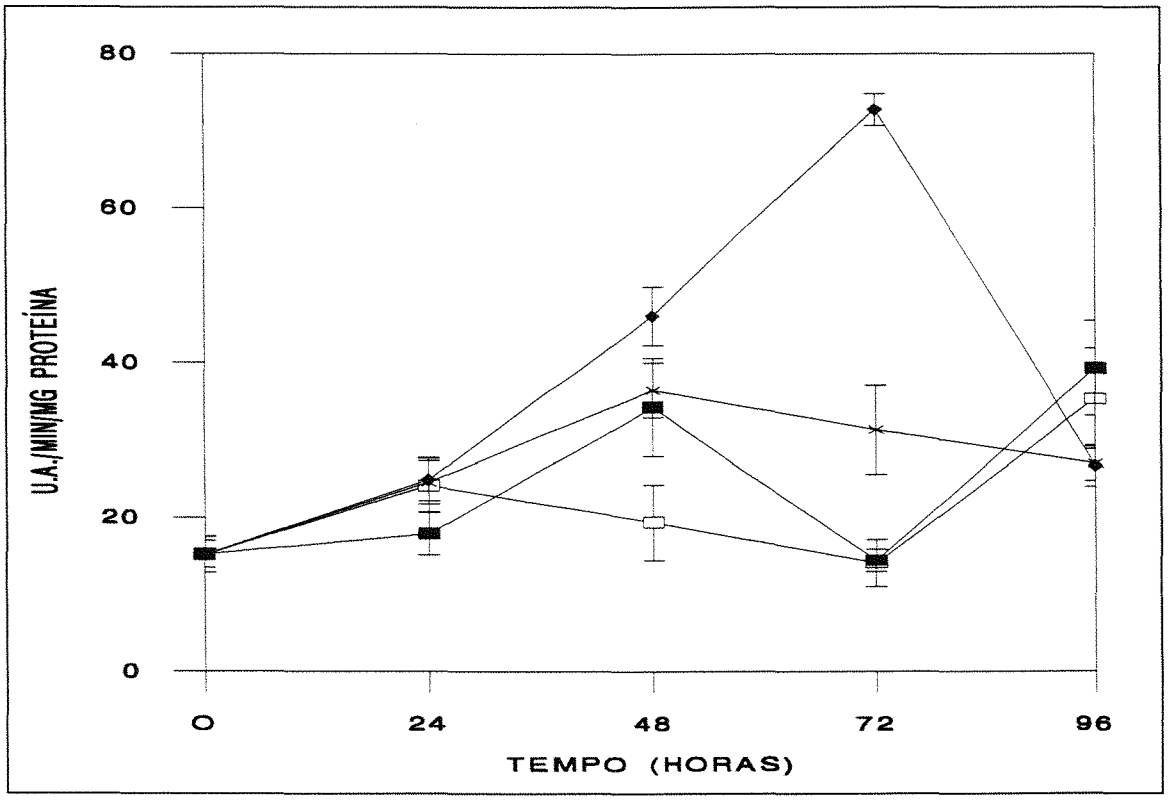


Figura 6. Atividade de β-1,3-glucanases em extratos obtidos de folhas de milho (cv. XL510), coletados até 96 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ água; ■ suspensão; ◆ suspensão autoclavada; × filtrado de suspensão autoclavada.

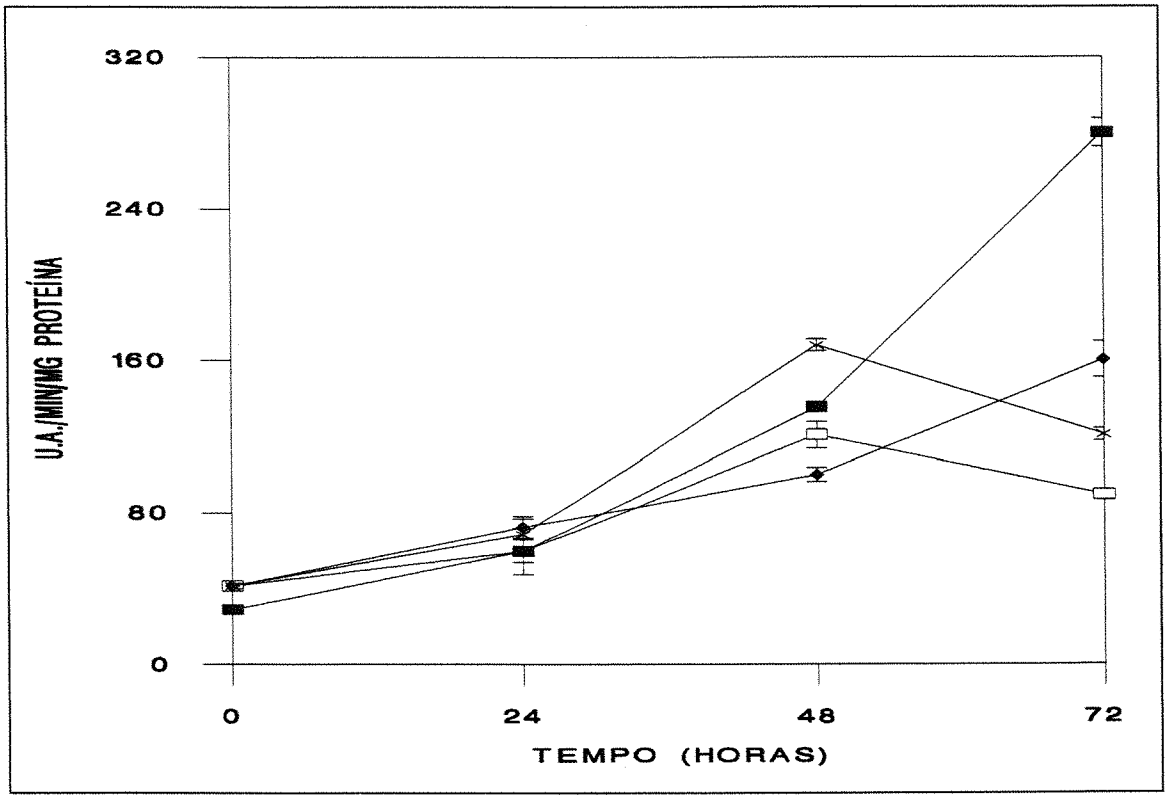


Figura 7. Atividade de peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de sorgo (cv. Brandes), coletados até 72 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (mantida em BDA) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ água; ■ suspensão; ◆ suspensão autoclavada; X filtrado de suspensão autoclavada.

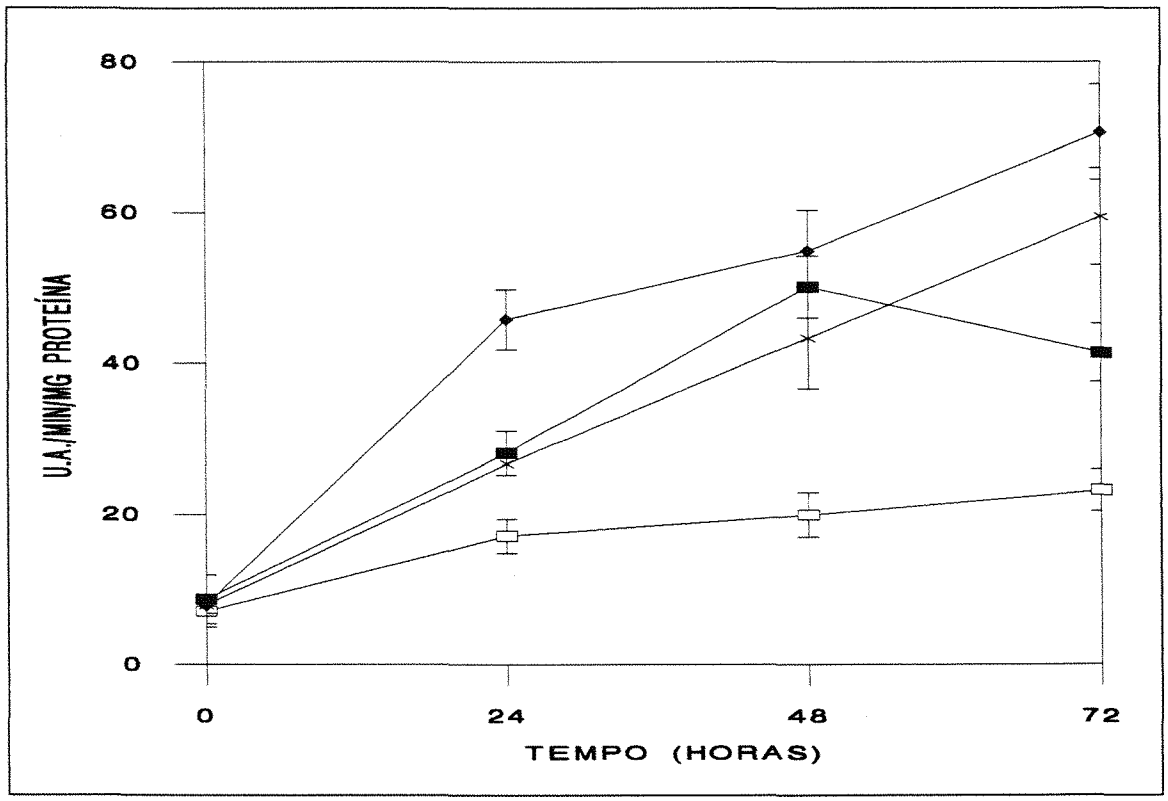


Figura 8. Atividade de peroxidases em extratos de folhas de sorgo (cv. Brandes), coletados até 72 horas após o tratamento com *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ água; ■ suspensão; ◆ suspensão autoclavada; × filtrado de suspensão autoclavada.

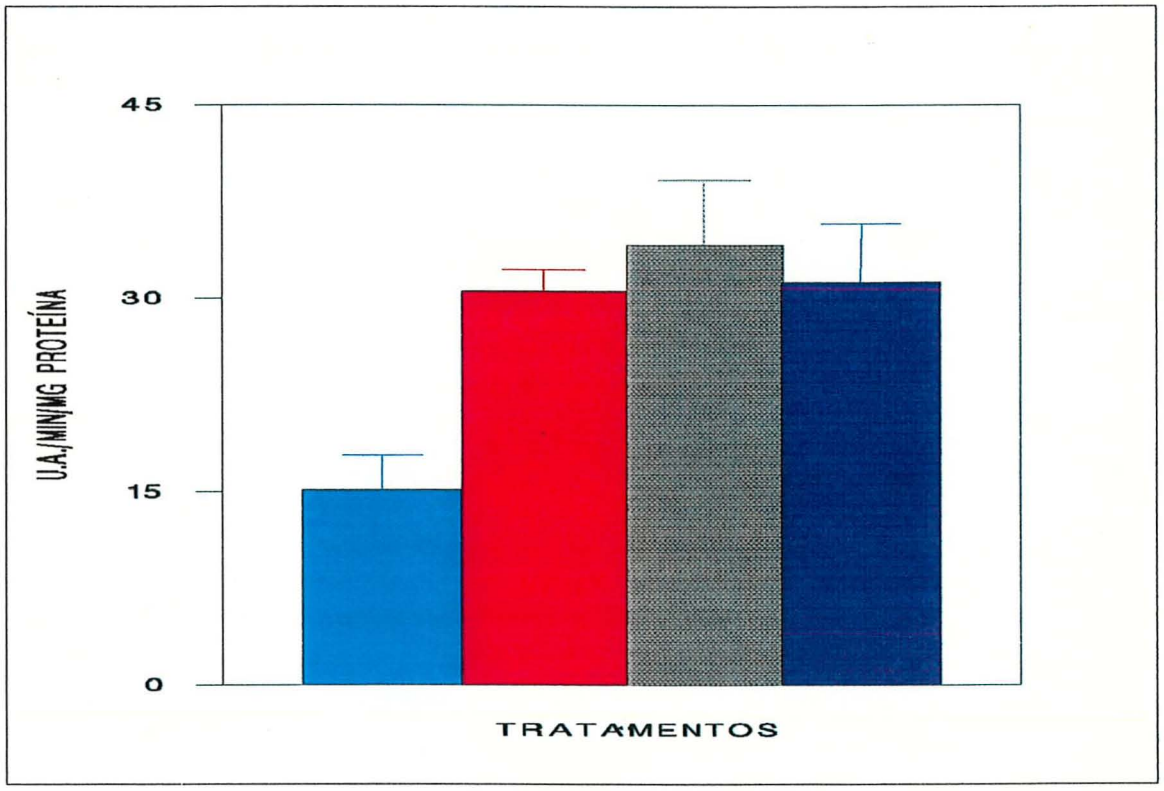


Figura 9. Atividade de peroxidases em extratos obtidos de folhas de sorgo (cv. Brandes), coletados 48 horas após tratamento com *S. cerevisiae* (mantidas em BDA) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: ■ água; ■ suspensão; ▦ suspensão autoclavada; ■ filtrado de suspensão autoclavada.

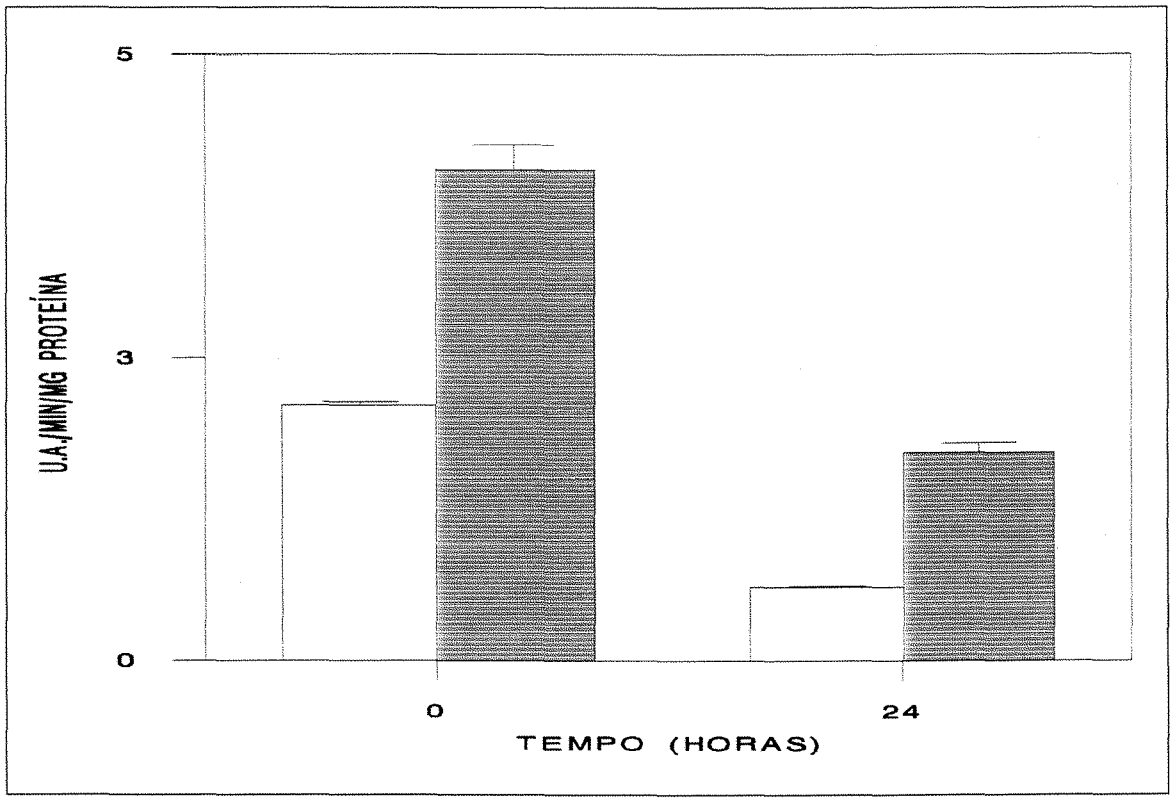


Figura 10. Atividade de peroxidases em extratos obtidos de células de *S. cerevisiae* (comercial) intactas ou homogeneizadas. Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: □ célula intacta; ■ célula homogeneizada.

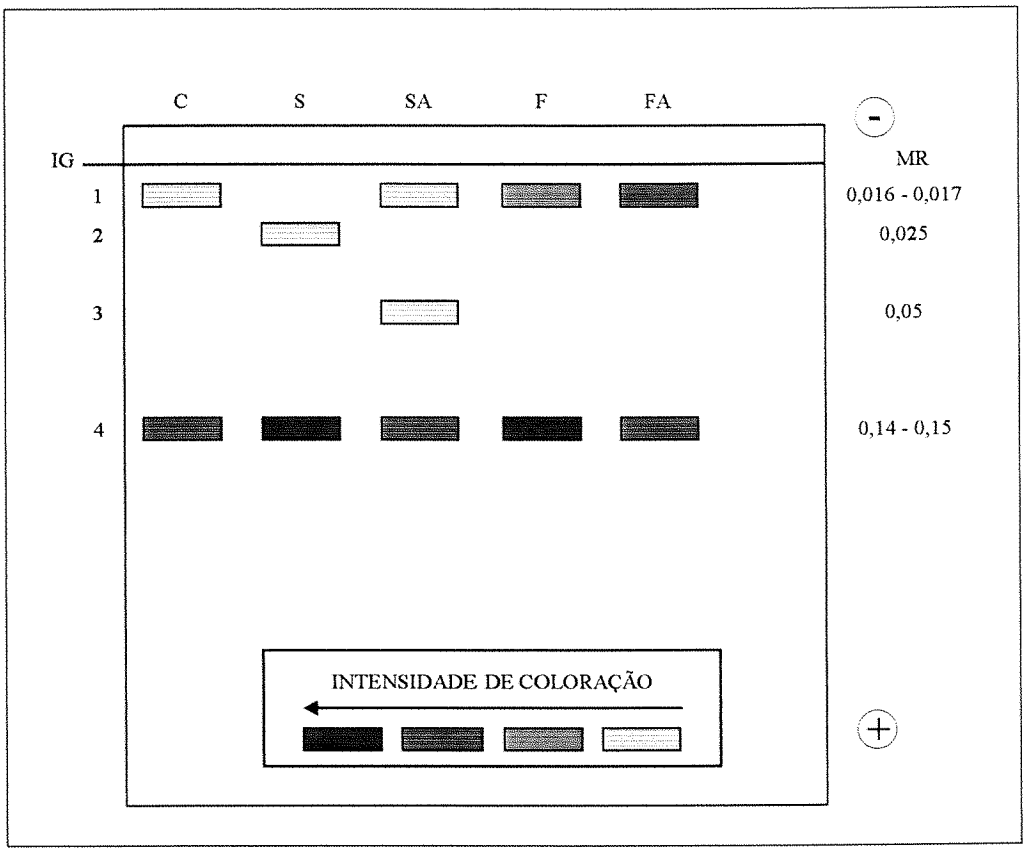


Figura 11. Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas de milho (cv. "South America Mushroon"), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para a visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas. MR = Mobilidade relativa

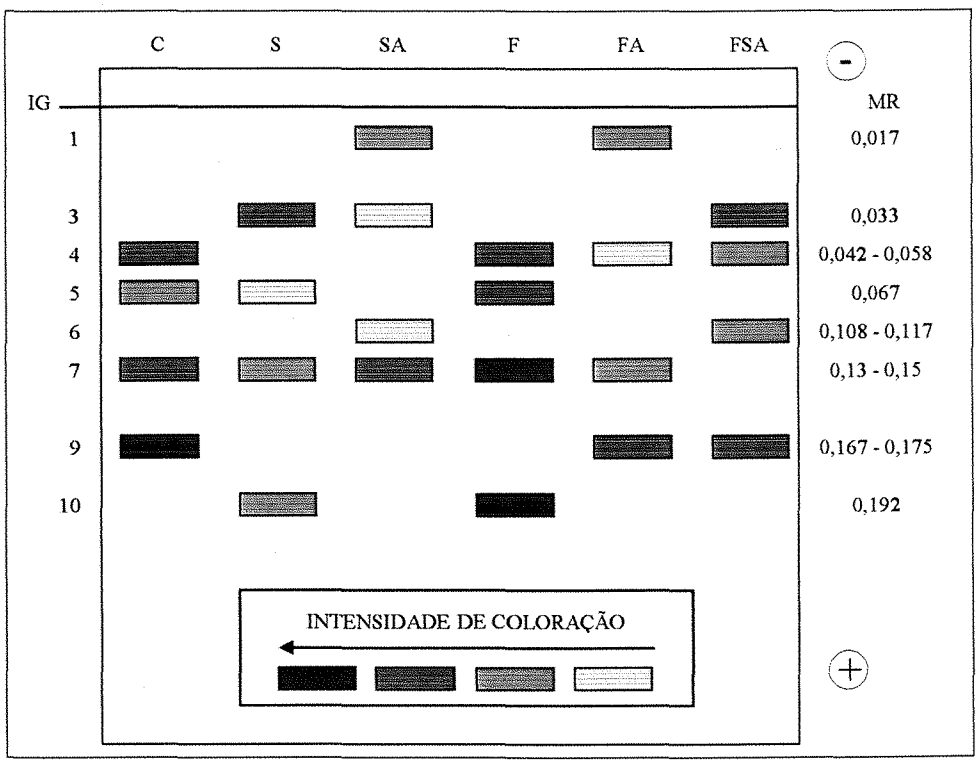


Figura 12. Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de mesocótilos de milho (cv. "South America Mushroon"), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado; (FSA) filtrado de suspensão autoclavada. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas. MR = mobilidade relativa.

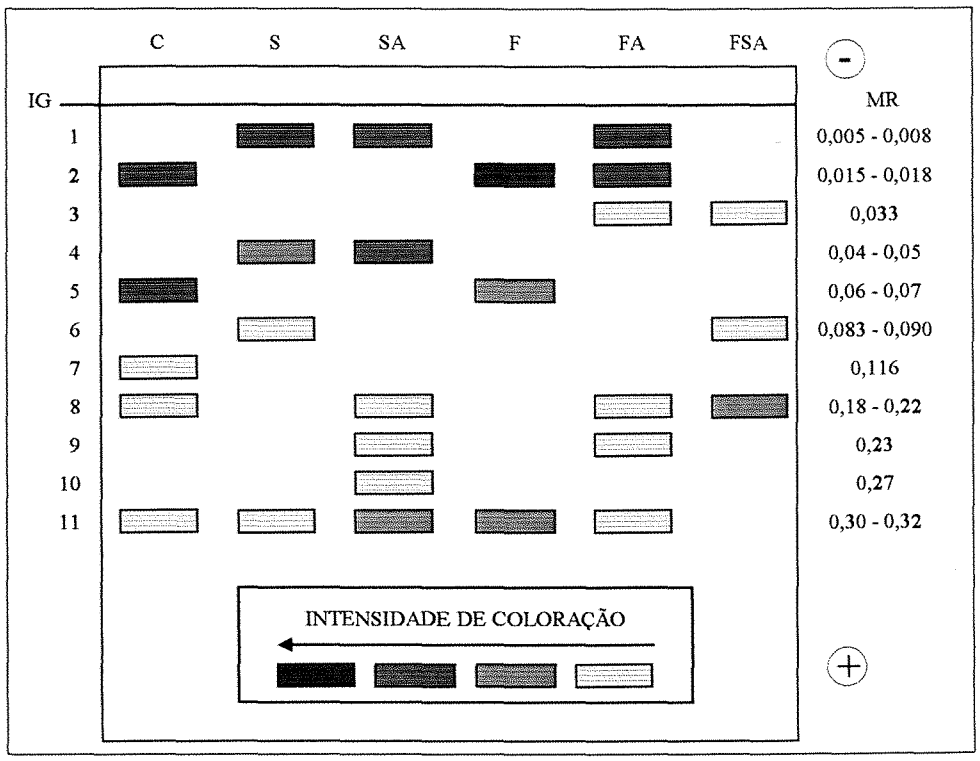


Figura 13. Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folha de sorgo (cv. Brandes), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado; (FSA) filtrado de suspensão autoclavada. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas. MR = Mobilidade Relativa.

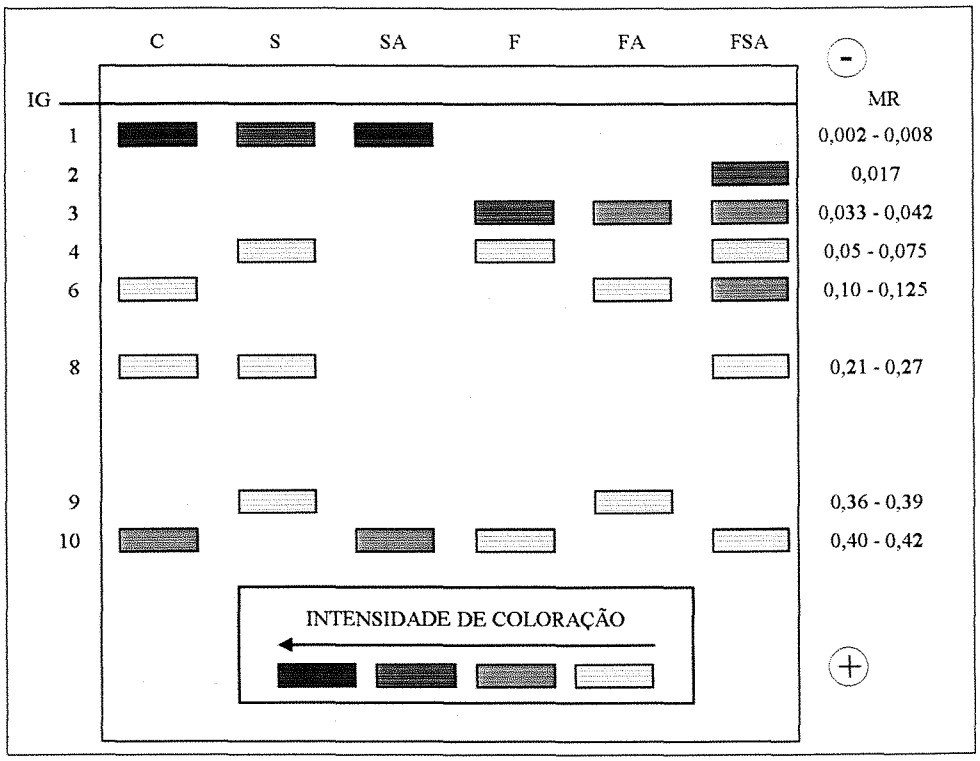


Figura 14. Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de mesocótilos de sorgo (cv. Brandes), obtidos após 48 horas e tratados com *S. cerevisiae* (comercial). Tratamentos: (C) controle-água; (S) suspensão; (SA) suspensão autoclavada; (F) filtrado; (FA) filtrado autoclavado; (FSA) filtrado de suspensão autoclavada. (IG) Interseção entre os géis concentrador e de corrida. Gel corado com guaiacol para visualização de isoenzimas de peroxidase. Números correspondem as bandas individuais das isoenzimas. MR = Mobilidade realativa.

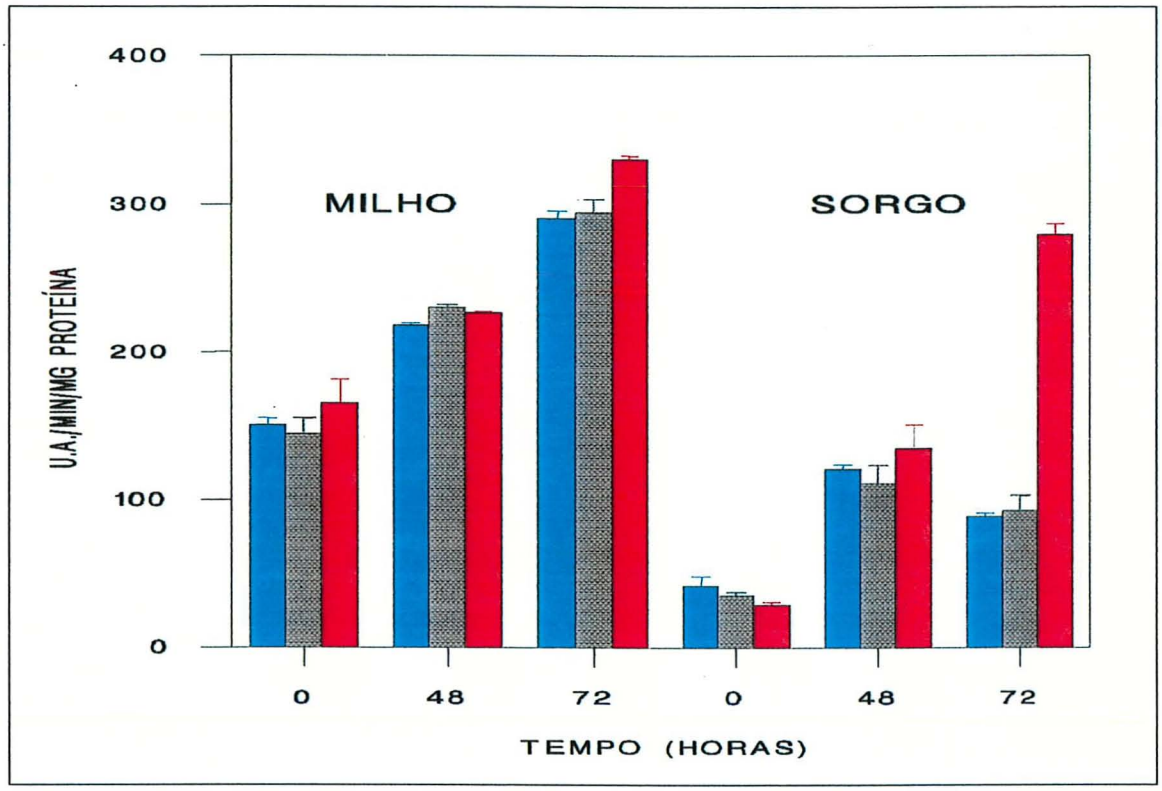


Figura 15. Atividade de peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de milho (cv. XL510) e sorgo (cv. Brandes), coletados em até 72 horas após o tratamento com suspensão de *S. cerevisiae* (mantida em BDA), lavado da placa contendo BDA e água destilada estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: ■ água; ▒ lavado da placa contendo BDA; ■ suspensão de células.

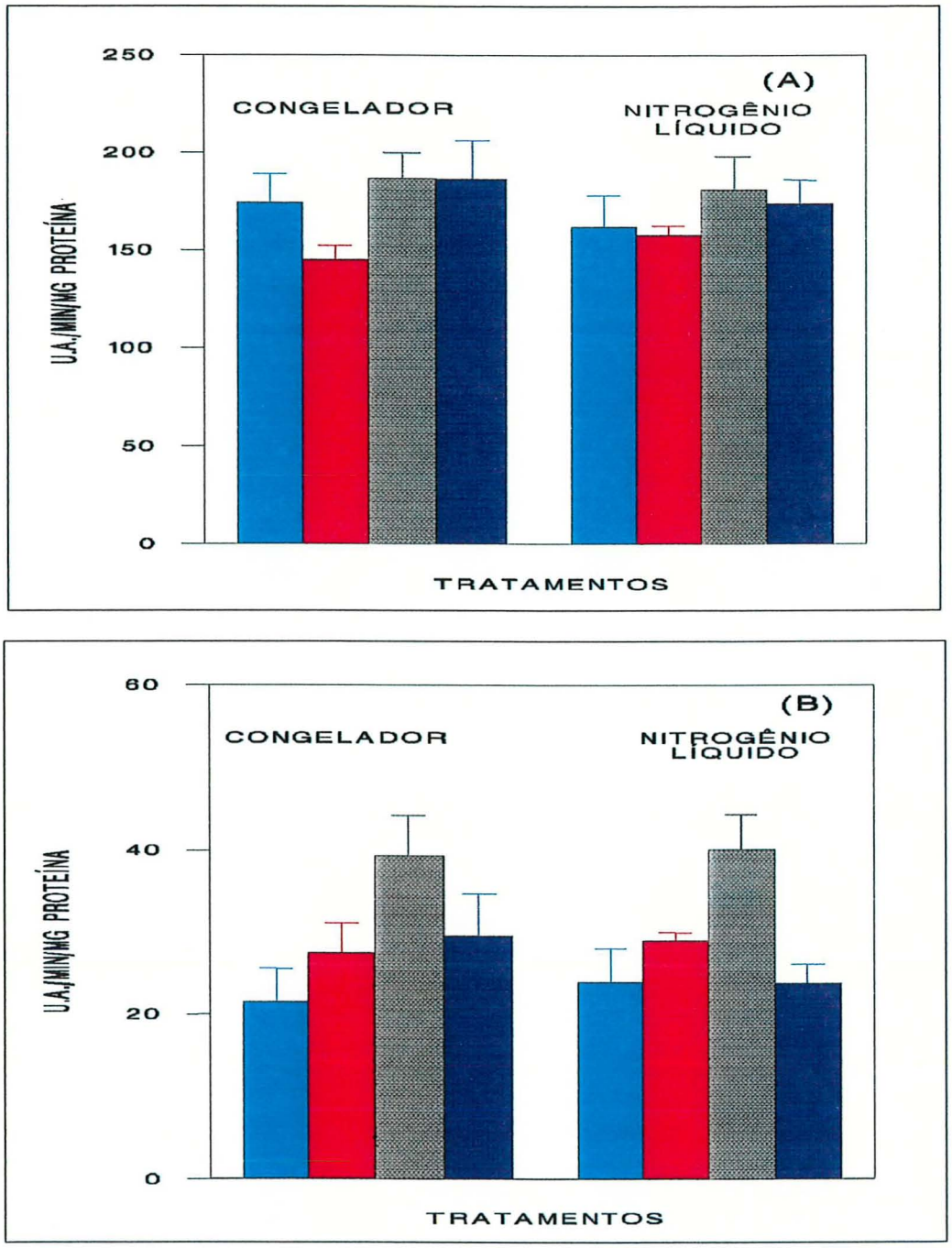


Figura 16. Atividade de peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de milho (A) (cv. XL510), e sorgo (B) (cv. Brandes), coletados 48 horas após o tratamento com preparações de *S. cerevisiae* (comercial) ou aspersão com água destilada estéril (controle). Amostras armazenadas em congelador ou previamente mergulhadas em nitrogênio líquido. Barras representam +/- erro padrão da média. Tratamentos: ■ água; ■ suspensão; ▒ suspensão autoclavada; ■ filtrado de suspensão autoclavada.

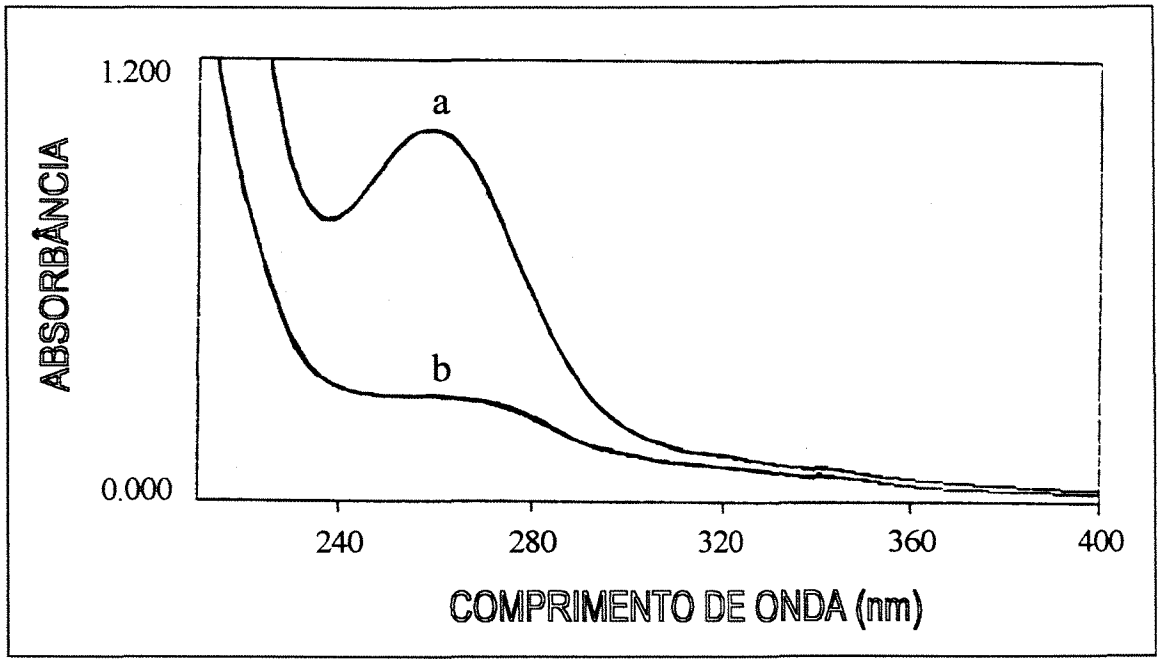
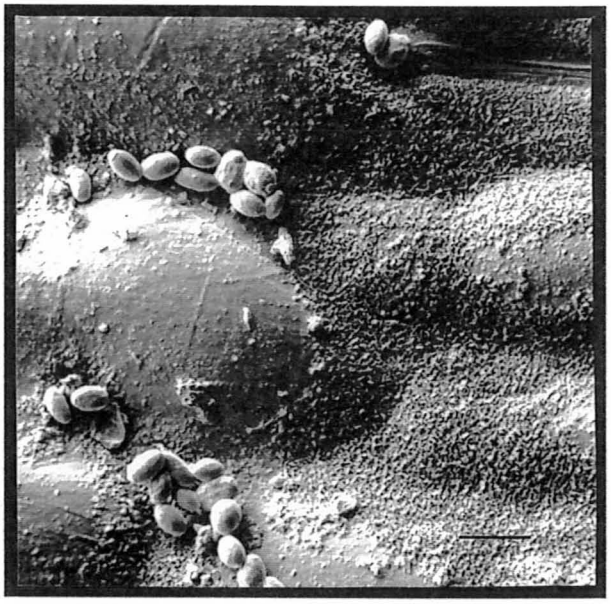


Figura 17. Perfil de absorção dos filtrados obtidos *S. cerevisiae* cultivadas em BDA ($1x10^8$ céls/mL) autoclavados (a) ou não autoclavados (b).



(A)

(B)

Figura 18. Padrão de deposição das células *de Saccharomyces cerevisiae* sobre folhas de milho (A) e sorgo (B) em microscopia eletrônica de varredura. Barras representam valor de 10 μm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBATTISTA, G. I.; COGHE, M.; MATTA, A. Phenols, polyphenol oxidase and peroxidase in pepper plants infected by virulent and avirulent strains of *Verticillium*. **Rivista di Patologia Vegetale**, v. 18, p. 5- 11, 1982.

ABELES, F.B.; BILES, C.L. Characterization of peroxidases in lignifing peach fruit endocarp. **Plant Physiolology**, v. 95, p. 269-273, 1991.

ABELES, F.B.; FORRENCE, L.E. Temporal and hormonal control of β-1,3-glucanase in *Phaseolus* vulgaris. **Plant Physiology**, v. 45, p. 395-400, 1970.

ABELES, F.B.; HERSHBERGER, W.L.; DUNN, L.J. Hormonal regulation and intracellular localization of a 33-kD cationic peroxidase in excised cucumber cotyledons. **Plant Physiology**, v. 89, p. 664- 668, 1988.

AGARWAL, V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1987. 176p.

AGRIOS, G.N. **Plant pathology** 4. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635 p.

ÁLCAZAR, M.D.; EGEA, C.; ESPÍN, A.; CANDELA, M.E. Peroxidase isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. **Physiologia Plantarum**, v. 94, p. 736-742, 1995.

ANDERSON, J.M. Membrane-derived fatty acid as precursors to second messengers. In: BOSS, W.F.; MORRE, D.J. (Ed.) **Second messengers in plant growth and development.** New York: Alan R. Liss, 1989. p.181-212.

ANURATHA, C.S.; HUANG, J.; PINGALI, A.; MUTHUKRISHNAN, S. Isolation and characterization of a chitinase and its cDNA clone from rice. **Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 5-10, 1992.

ANURATHA, C.S.; ZEN, K-C.; COLE, K.C.; MEW, T.; MUTHUKRISHNAN, S. Induction of chitinases and β-1,3-glucanases in *Rhizoctonia solani*- infected rice plants: Isolation of infection-related chitinase cDNA clone. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 39-46, 1996.

ARORA, Y.K; BAJAJ, K.L. Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of mung bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 114 , p. 325- 331, 1985.

ASIEGBU, F.; GEOFFREY, D.; JOHANSSON, M. Studies on the infection of norway spruce roots by *Heterobasidion annosum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 1552- 1561, 1993.

AYRES, A.R.; EBEL, J.; VALENTE, B.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology**, v. 57, p.760- 765, 1976a.

AYRES, A.R.; VALENT, B.S.; EBEL, J.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. **Plant Physiology**, v. 57, p. 766-774, 1976b.

BAILEY, J. A. Mechanisms of phytoalexin accumulation. In: BAILEY, J. A.; MANSFIELD, J. A. (Ed.) **Phytoalexins**. London: Blackwell, 1982. p. 289-318.

BAKER, K.F.; COOK, R.J. Role of the antagonist in biological control. In: BAKER, K.F.; COOK, R.J. (Ed.) **Biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1976. cap. 7, p. 170-216.

BASHAN, Y.; OKON, Y.; HENIS,Y. Peroxidase, polyphenol-oxidase, and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato plants. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, p. 366-372, 1987.

BELL, A. A. The time sequence of defense. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. (Ed.) **Plant disease an advanced treatise**: how plants defend themselves. New York: Academic Press, 1980. v. 5, p. 53-73.

BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P.J.; NICOLE, M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt and rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. **Phytopathology**, v. 84, n.12, p. 1432- 1444, 1994.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças em plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap. 2, p. 13-31.

BERGMEYER, H.U.; GAWEHN, K.; GRASSE, M. Enzymes as biochemical reagents. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.) **Methods of enzymatic analysis**. 2. 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.V. (Ed.) **Methods of enzimatic analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1965. p. 990-991

BETTIOL,W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In. BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1991. cap. 1, p. 1-5.

BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phyloplane. **Annual Review of Phytopathology**, v. 20, p. 167- 192, 1982.

BOL, J.F.; VANKAN, A. L. The synthesis and possible function of virus-induced proteins in plants. **Microbiological Sciences**, v.5, p. 47-52, 1988.

BOLLER, T. Induction of hydrolases as defense reaction against pathogens. In: KEY, J.L.; KOSUGE, T. (Ed.) **Cellular and molecular biology of plant stress.** New York: Alan R. Liss, 1985. p. 247-262

BOLLER, T. Hydrolytic enzynes in plant disease resistance . In: KOSUGE, T.; NESTER,E.W. (Ed.) **Plant-microbe, interactions, molecular and genetic perspectives**. New York: Mac Millan, 1987. v. 2, p. 385-413.

BOLLER, T. Primary signal and second messengers in the reaction of plants to pathogen. In: BOSS, W.F.; MORRÉ, D.J. (Ed.) **Second messengers in plant growth and development**. New York: AR Liss, 1989. p. 227-255.

BOLLER, T. Antimicrobial functions of the plant hydrolases chitinase and β-1,3-glucanase. In: FRITIG, B.; LEGRAND, M. (Ed.) **Mechanisms of plant defense responses**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 391-400.

BONATTI, P.M.; LORENZINI, G.; FORNASIERO, R.B.; NALI, C.; SGARBI, E. Cytochemical detection of cell wall bound peroxidase in rust infected broad leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 140, p. 319-325, 1994.

BOSTOCK, R.M.; KUĆ, J.; LANE, R.A. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. **Science,** v. 212, p. 67-69, 1981.

BOWLES, D.J. Defense related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 873-907, 1990.

BOYER, N.; DE JAEGHER, G. Direct or indirect role of peroxidase in ethylene biosynthesis? In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T.H. (Ed.) **Molecular and physiological aspects of plant peroxidases.** Geneva: Imprimiere Nationale, 1986. p. 47-60.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, M.R.; COSTA, A. P. C.; DIETRICH, S.M.C. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. **Carbohydrate Research in Brazil**, v. 45, n. 1, p. 76-80, 1993.

BUCHELI, P.; BUCHALA,A.J.; MEIER, H. Autolysis *in vitro* of cotton (*Gossypium hirsutum*) fiber cell. **Physiologia Plantarum**, v. 70, p. 633-638, 1987.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B. Yeast cell wall and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, p. 763-793, 1982.

CACHINERO, J. M.; CABELLO, F.; JORRIN, J.; TENA, M. Induction of different chitinase and β-1,3-glucanase isoenzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings in response to infection by *Plasmopara halstedii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 401-405, 1996.

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**, v. 31, p. 51-67, 1987.

CARR, J.P.; KLESSIG, D.F. The pathogenesis-related proteins of plants. In: JANE K. SELTON (Ed.) **Genetic engineering:** principles and methods. New York: Plenum Press, 1990. v. 2, p. 65-109.

CARROL, P.V.; ANDERSON, J.O.; SHERWOOD, R.T. Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. **Plant Physiology**, v. 57, p. 920-922, 1976.

CARROL, R.B.; LUKEZIC, F.L. Induced resistance in alfafa to *Corynebacterium insidiosum* by prior treatment with avirulent cells. **Phytopathology**, v. 62, n. 5, p. 555-563, 1972.

CARTWRIGHT, D; LANGCAKE, P.; PRYCE, R.J.; LEWORTHY, D.P.;RIDE, J.R. Chemical activation of host defence mechanisms as a basis for crop protection. **Nature**, v. 267, p. 511- 513, 1977.

CARUSO, F.; KUĆ, J. Protection of watermelon and muskmelon against *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 14, p. 191- 201, 1979.

CHANCE, B. MAEHLY, A.C. Assay of catalases and peroxidases. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Ed.) **Methods in enzymology**. 3. ed. New York: Academic Press, 1955. v. 2 p. 764- 775.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Involvemente of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants. **Science**, v. 262, p. 1883-1886, 1993

CHEONG, J.-J.; HAHN, M.G. A specific, high-affinity binding site for the hepta-β-glucoside elicitor exists in soybean membranes. **Plant Cell**, v. 3, p. 137-147, 1991.

COFFEY, M.D.; CASSIDY, D.S.M. Peroxidase activity and induced lignification in rust flax interaction varying in their degree of incompatibility. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 134-141, 1984.

COHEN, Y. 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, p. 273-288, 1994.

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **Plant Journal**, v. 3, p. 31-40, 1993.

COMPTON, L.P. **Agronomia del sorgo**. Patancheru: ICRISAT, 1990. 75p.

COOK, R.J. Biological control of the pathogens: theory to application. **Phytopatology**, v. 75, n. 1, p. 25-29, 1985.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

CORDERO, M.J.; RAVENTÓS, D.; SAN SEGUNDO, B. Differential expression and induction of chitinases during germination of maize seeds. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 7, n. 1, p. 23-31, 1993.

COSIO, E.G.; FREY, T.; EBEL, J. Identification of a high-affinity binding protein for a hepta-β-glucoside phytoalexin elicitor in soybean. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 1115-1123, 1992.

CRUZ, I. ; WAQUIL, J.M.; VIANA, P.A.; VALICENTE, F.H. Pragas, diagnóstico e controle. **Arquivo do Agrônomo,** POTAFOS , n. 2, p. 9-24, 1995.

DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p. 243-275, 1984.

DEAN, R. A.; KUĆ, J. Induced systemic protection in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 3 , n.5 , p.125-129, 1985.

DEAN, R. A.; KUĆ, J. Induced systemic protection in cucumber: Effects of inoculum density on sympton development caused by *Colletotrichum lagenarium* in previously infected and uninfected plants. **Phytopathology**, v. 76, n. 2, p. 186- 189, 1986.

DECEDUE, C.J.; ROGRES, S.J.; BORCHERT, R. Molecular weight diferences among potato peroxidases. **Phytochemistry**, v. 23, p. 723-727, 1984.

DIXON, R. A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 339-367, 1990.

DOBBS, C.G; HINSON, W.H. A widespread fungistasis in soil. **Nature**, v. 72, p. 197-199, 1953.

DROBY, S.; CHALUTZ, E.; WILSON, C.L. Antagonistic microrganisms as biological control agents of postharvest diseases of fruits and vegetables. **Postharvest News Information**, v. 2, p. 169-173, 1991.

DUKE, N.; RAMIREZ, A .V.; TOMIYAMA, K. Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. **Journal of Phytopathology**, v. 119, p. 232-239, 1987.

ELAD, Y.; CHET, I. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Phytium* damping off by bacteria. **Phytopathology**, v. 77, p. 190- 195, 1987.

ELLISTON, J.E.; KUĆ, J.; WILLIANS, E.B. Induced resistance to bean anthracnose at a distance from the site of the inducing interaction. **Phytopathology**, v. 61, n. 9, p. 1110-1112, 1971.

ESPELIE, K.E.; FRANCESCHI, V.R.; KOLATTUKUDY, P.E. Immuno cytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound- healing potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v. 81, p. 487-492, 1986.

FANCELLI, A.L. **Plantas alimentícias**: (guia para aula, estudos e discussão). Piracicaba: ESALQ, Departamento de Agricultura, 1986. 13p.

FARKAS, G.L.; STARMANN, M.A. On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by souther bean mosaic virus. **Phytopathology**, v. 56, p. 669-677, 1966.

FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 87, p. 7713-7716, 1990.

FAWCETTI, H.S.; LEE, H. A. **Citrus diseases and their control**. New York: Mc Graw-Hill, 1926. 582p.

FEHRMANN, H.; DIMOND, A. E. Peroxidase activity and *Phytophthora* resistance in different organs of the potato plant. **Phytopathology**, n. 57, p. 69-72 , 1967.

FERREIRA, A. S.; CASELA, C.R.; FERNANDES. F.T. Doenças do sorgo. **Informe Agropecuário**, v. 12, n. 144, p. 52-58, 1986.

FLEET, G.H. Cell walls. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.) **The yeasts**. 2. ed. London: Academic Press, 1991. v. 4, cap. 5, p. 199-277.

FOKKEMA, N.J.; den HOUTER, J.G.; KOSTERMAN, Y.J.C.; NELIS, A.L. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonist effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. **Transactions British Mycological Society**, v. 72, p. 19-29, 1979.

FREDERIKSEN, R.A. **Compendium of sorghum diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1986. 82p.

FREITAS, J.C. ; ZARAMELA, G.S.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de agentes bióticos e abióticos no acúmulo de um complexo de pigmentos e fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 349. 1993.

FRIC, F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, P.H. (Ed.) **Physiological plant pathology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1976. p. 617-631.

FRIEDRICH, L.; LAWTON, K.; RUESS, W.; MASNER P.; SPECKER, N.; RELLA, M.G.; MEIER, B.; DINCHER, S.; STAUB, T.; UKNEY, S.; MÉTRAUX, J. P.; KESSMANN, H.; RYALS, J. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquirede resistance in tobacco. **The Plant Journal**, v. 10, n.1, p. 61-70, 1996.

GANDER, J.E. Fungal cell wall glycoproteins and peptido-polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, v. 28, p. 103-119, 1974.

GARRET, S.D. Toward biological control of soil-borne plant pathogens. In: BAKER, K.F; SNYDER, W.C. (Ed.) **Ecology of soil-borne plant pathogens**. Los Angeles: University of California Press, 1965. p. 4-17.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPIN, H. **Peroxidases 1970-1980**. Geneva: Universidade de Geneva, Centre de Botanique, 1982. 324 p.

GENNIS, R.B. **Biomembranes: molecular structure and function.** New York: Springer-Verlag, 1989. 533 p.

GOODMAN, R.N.; KIRÁLY, Z.; WOOD, K.R. Secondary metabolites. In: GOODMAN, R.N. (Ed.) **The biochemistry and physiology of plant disease**. Missouri: University of Missouri Press, 1986. cap. 6, p. 211-224.

GODOY, C.V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C.L. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.)

Manual de fitopatologia: Doenças da plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. v. 2, cap. 17, p. 184-200.

GRAHAM, T.L.; GRAHAM, M.Y. Cellular coordination of molecular responses in plant defense. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 4, n. 5, p. 415-422, 1991.

GRISON, R.; PILET, P.E. Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. **Journal of Plant Physiology**, v. 118, p. 189-199, 1985a.

GRISON, R.; PILLET, P.E. Properties of syringaldazine oxidase/peroxidase in maize roots. **Journal of Plant Physiology**, v. 118, p. 201-208, 1985b.

GROSS, G.G. Recent advances in the chemistry and biochemistry of lignin. In: SWAIN, T.; HARBONE, J.B.; VANS SUMERE, C.F. (Ed.) **Biochemistry of plant phenolics**. Ghent: Plenum Press, 1979. v. 12, p. 177-220.

GUZZO, S.D.; MARTINS, M.F. Local and systemic induction of β-1,3-glucanase and chitinase in coffea leaves protected against *Hemileia vastratix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 144, p. 449-454, 1996.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F.; BACH, E.E.; MORAES, W.B.C.; MARSIGLIO, A.F.; LOPEZ, A.M.Q. Indução de resistência em cafeeiros suceptíveis à *Hemileia vastratix* por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n. 12, p.130, 1987a.

GUZZO, S.D.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 377-385, 1987b.

HADWIGER, L.; BECKMAN, J.M. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. **Plant Physiology**, v. 67, p. 170- 173, 1980.

HADWIGER, L.A; OGAWA, T.; KUYAMA, H. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal supression are verified with synthesized oligomers. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 7, n. 4, p. 531-533, 1994.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 347-369, 1989.

HAHN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology,** v. 62, p. 107-111, 1978.

HAHN, M.G.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology**, v. 68, p. 1161- 1169, 1981.

HAHN, M.G.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P.; BERGMANN, C.; CHEONG, J.; KOLLER, A.; LÒ, V. Preparation and characterization of oligosaccharide elicitors of phytoalexin accumulation. In: GURR, S.J.; McPHERSON, M.J.; BOWLES, D.J. **Molecular plant pathology**: a pratical approach. Oxford: Oxford University Press, 1992, v. 2. cap. 8, p. 103-147.

HALL, J.L.; SEXTON, R. Citochemical localization of peroxidase activity in root cells. **Planta**, v. 108, p. 103-120, 1972.

HAM, K.S.; KAUFFMANN, S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Host-pathogen interaction XXXIX. A soybean pathogenesis-related protein with β-1,3-glucanase activity releases phytoalexin elicitor-active heat-stable fragments from walls. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 545-552, 1991.

HAMILL, D.E.; BREWBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. IV. The peroxidase isoenzymes of maize (*Zea mays*). **Physiologia Plantarum**, v. 22, p. 945- 958, 1969.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUĆ, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology,** v. 20, p. 62-71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R; NUCKLES,E.M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

HARE, R.C. Indoleacetic acid oxidase. **Botanical Review**, v. 30, p. 129-165, 1964.

HARKIN, J.M.; OBST, J.R. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. **Science**, v. 180, p. 296-298, 1973.

HASCHKE, R.; FRIEDHOFF, J.M. Calcium-related properties of horseradish peroxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 80, n. 4, p. 1039-1042, 1978.

HEITEFUSS, R.; WILLIAMS, PH. **Physiological plant pathology**. New York: Springer Verlag, 1976. 888 p. Encyclopedia of Plant Physiology,4.

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.

HOFFLAND, E. PIETERSE, CM.J.; BIK, L.; van PELT, J.A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogen- related proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 309-320, 1995.

HOUGH, J.S. **Biotecnología de la cerveza y de la malta**. Zaragoza: Ed. ACRIBIA, 1990. 194p.

HOUSE, L.R. **A guide to sorghum breeding**. Andrhra Pradesh: ICRISATI, 1985. 256p.

HU, C.; SMITH, R.; van HUYSTEE, R. Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and anionic isozymes. **Journal of Plant Physiology**, v. 135, p. 391-397, 1989.

HUYNH, Q.K.; HIRONAKA, C.M.; LEVINE, E.B.; SMITH, C.E.; BORGMEYER, J.R.; SHAH, D.M. Antifungal proteins from plants: purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 6635-6640, 1992.

INOVA, T.M.; DAVYDOVA, M. A.; RUBIN, B.A. On catalytic functions of peroxidase. **Biochimie** , v. 32, p. 607-611, 1967.

JENNS, A.E.; KUĆ, J. Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. **Phytopathology**, v. 69, p. 753-756, 1979.

KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; GEOFFREY, P.; FRITIG, B. Biological functions of pathogenesis-related proteins: four pathogenesis-related proteins of tobacco have β-1,3-glucanase activity. **The EMBO Journal**, v. 6, p. 3209-3212, 1987.

KEEN, N.T.; YOSHIKAWA, M. β-1,3-endoglucanases from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungal cell walls. **Plant Physiology**, v. 71, p. 460-465, 1983.

KEEN, N.T.; YOSHIKAWA, M.; WANG, M.C. Phytoalexin elicitor activity of carbohidrates from *Phytophthora megasperma* f.s. *glycinea* and other sources. **Plant Physiology**, v. 71, p. 466-471, 1983.

KERBY, K.; SOMERVILLE, S. Purification of an infection-related extracellular peroxidase from barley. **Plant Physiology**, v. 100, p. 397-402, 1992.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMAN, C.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994.

KIM, S.H.; TERRY, M.E.; HOOPS, P.; DAUWALDER, M.; ROUX, S.J. Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. **Plant Physiology**, v. 88, p. 1446-1453, 1988.

KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A. ; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia:** princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 34, p. 692-709.

KLEMENT, Z.; GOODMAN, R.N. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 5, p. 17-44, 1968.

KLESSIG, D.F. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. **Trends in Cell Biology**, v. 4, p. 334- 338, 1994.

KOSUGE, T. The role of phenolics in host response to infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 7, p. 195-222, 1969.

KRAGH, K.M.; JACOBSEN, S.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.A. Purification and characterization of the three chitinases and one β-1,3-glucanase accumulating in the medium of cell suspension cultures of barley. **Plant Science**, v. 76, p. 65-77, 1991.

KREUTZFELDT,C.; WITT, W. Structural biochemistry. In: TUITE, M.F.; OLIVER, S.G. (Ed.) ***Saccharomyces*:** biotechnology handbooks. New York: Plenum Press, 1991. cap. 2, p. 5-58.

KU, H.S.; YANG, S.F.; PRATTE, H.K. Inactivity of apoperoxidase in indoleacetic acid oxidation and ethylene formation. **Plant Physiology**, v. 45, p. 358-359, 1970.

KUĆ, J. Plant protection by the activation of latent mechanisms for resistance. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 83, suppl. 1, p. 463-471, 1977.

KUĆ, J. Induced immunity to plant disease. **Bio Science**, v. 32, p. 854-860, 1982.

KUĆ, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: CHET, H. (Ed.) **Innovative approaches to plant disease control**. New York: John Willey, 1987. cap. 12, p..255-274.

KUĆ, J. Systemic induced resistance. In: ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS. **Aspects of applied biology 42**: physiological responses of plants to pathogens. Dundee: Association of applied biologists, 1995. p. 235-242.

KUĆ, J.; PRESSIG, C. Fungal regulation of disease resistance mechanisms in plants. **Mycologia**, v. 76, p. 767-784, 1984.

KUĆ, J.; RUSH, C. Phytoalexins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 26, n. 2, p. 455-472, 1985.

KUĆ, J.; SHOCKLEY, G.; KEARNEY, K. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 7, p. 195- 200, 1975.

LAMB, C. J.; LAWTON, M. A.; DROM, M.; DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses agaisnt microbial attack. **Cell,** v. 56, p. 215-224, 1989.

LARENA, I.; MELGAREJO, P. Biological control of *Monilinia laxa* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by a lytic enzyme-producing *Penicillium purpurogenum*. **Biological Control**, v. 6, n. 3, p. 361-367, 1996.

LEGRAND, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFREY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, v. 84, p. 6750-6754, 1987.

LEINHOS, G.M.E; BUCHENAUER, H. Inhibition of rust diseases of cereals by metabolic products of *Verticillium chlamydosporium*. **Journal of Phytopathology**, v. 136, p. 177-193, 1992.

LEITE, B. Controle de germinação de *Colletotrichum graminicola*: mecanismos e perspectivas. **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 1, p. 55-59, 1993.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. In: LUZ,C.W.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Revisão anual de patologia de plantas, 1997. v. 5, p. 235-280.

LEVER, M. A new reactions for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 273-279, 1972.

LIU, E.H. Substrate specificities of plant peroxidase isozymes. In: MARKERT, C.L. (Ed.) **Isozymes II:** physiological functions. New York: Academic Press, 1975. p. 837- 849.

LOJKOWSKA, E.; HOLUBOWSKA, M. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in potato tuber resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora*. **Journal of Phytopathology**, v. 136, p. 319-328, 1992.

LOPEZ, A.M.Q. Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (CES) Wills em sorgo (*Sorghum bicolor* L.(Moench)) Rio Claro, 1991. 203p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

LOPEZ, A.M.Q. Fitoalexinas em sorgo - papel na interação com fungos patogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 19, n. 1, p. 59-62, 1993.

LOZANO, J.C.; SEQUEIRA, L. Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco leaves by heat-killed cells of P*seudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 60, p. 875-877, 1970.

LÜCK, H. Peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.) **Methods of enzymatic analysis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1965. p. 895-897.

LUSSO, M.F.G. Alteração na atividade e no perfil eletroforético da enzima peroxidase em mesocótilos e folhas de milho (*Zea mayz* L.) em resposta à inoculação com *Helminthosporium maydis*, raça 0, *Helminthosporium carbonum* raça 1 e à injúria mecânica. Piracicaba, 1989. 109p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LUSSO, M.F.G.; KUĆ, J. Increased activities of ribonuclease and protease after challenge in tobacco plants with induced systemic resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 47, p. 419-428, 1995.

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical or fungal inoculation. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, 1997. (aceito para publicação)

LUZ, W.C. **Diagnose e controle das doenças da espiga de milho no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA, 1995. 28 p. (Circular Técnica, 5)

LYON, G.D.; REGLINSK,T.; FORREST,R.S.; NEWTON, A.C. The use of resistance elicitors to control plant diseases. IN: ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS. **Aspects of applied biology 42**: physiological responses of plants to pathogens. Dundee: Association of applied biologists, 1995. p. 227-234.

LYON, P.C.; WOOD, K.V.; NICHOLSON, R.L. Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 29, p. 97-101, 1990.

MADAMANCHI, N.R.; KUĆ, J. Induced systemic resistance in plants In: COLE, G.T.; HOCH, H.C. (Ed.) **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum Press, 1991. p. 347-362.

MAEHLY, A.C. Plant peroxidase. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.Q. (Ed.) **Methods in enzimology**. New York: Academic Press, 1955. p. 801-813.

MAEHLY, A.C.; CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. In: GLICK, D. (Ed.) **Methods of biochemical analysis.** New York: Interscience Publishers, 1954. v.1, p.354-408.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. ; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1995. 27 p. (Circular técnica, 20)

MALAMY, J.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid and plant disease resistance. **The Plant Journal**, v. 2, n. 5, p. 643-654, 1992.

MALOY, O.C. **Plant disease control:** principles and practice. New York: John Wiley, 1993. 346 p.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; PRATELLA, G.C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. **Biological Control**, v. 7, n. 1, p. 30-37, 1996.

MARLEY, P.S.; HILLOCKS, R.J. The role of phytoalexins in resistance to *Fusarium udum* wilt in pigeon pea (*Cajanus cajar*). **Plant Pathology**, v. 42, p. 212-218, 1993.

MARTINS, E.M.F. Controle da ferrugem do caffeiro (*Hemileia vastatrix*) através da indução de resistência. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991. cap. 24, p. 345-363.

MARTINS, E.M.F.; MARIA, A.C. de; GRÜNEWALDT-STÖCKER, G.; MORAES, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 899-909, 1986.

MAUCH, F.; HADWIGER, I.A.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two β-1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiology**, v. 87, p. 325-333 1988.

McINTYRE, J.L.; DODDS, J.A.; HARE, J.D. Effects of localized infections of *Nicotiana tabacum* by tobacco mosaic virus on systemic resistance against diverse pathogens and insect. **Phytopathology**, v. 71, p. 297- 301, 1981.

MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology,** v. 105, p. 467-472, 1994.

MICHEREFF, S.J.; MENEZES, M. e MARIANO, R.L.R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopatologica** , v. 19, n. 1, p. 14-17, 1993.

MISAGHI, I.J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions.** New York: Plenum Press. 1982. 286 p.

MOHAN, R.; KOLATTUKUDY, P.E. Differential expression of a suberization-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistance and sensitive tomato

lines by elicitors of *Verticillium albo-atrum*. **Plant Physiololgy,** v. 92, p. 276-280, 1990.

MOLANO, J.; POLACHECK, I.; DURAN, A.; CABIB, E. An endochitinase from wheat germ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 4901-4907, 1979.

MORAES, W.B.C. Controle alternativo aplicado a cultura do café. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. **Anais**. Piracicaba, 1989. p. 36-44.

MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CONTROLE BIOLÓGICO, 2., Brasília, 1990. **Anais.** Brasília: CENARGEN , 1990. p. 60-61.

MORAES, W.B.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasilia: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1991. cap. 10, p. 157-179.

MORSE, M.J., SATTER, R.L.; CRAIN, R.C.; COTE,G.G. Signal transduction and phosphatidylinositol turnover in plants. **Physiologia Plantarum**. v. 76, p. 118-121, 1989.

NASSER, W.; TAPIA, M. de, KAUFFMANN, S.,MONTASSER-KOUSHARI, S.; BURKARD, G. Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR-proteins are chitinases. **Plant Molecular Biology**, v. 11, p. 529-538, 1988.

NETZER, D.; KRITZMAN, G.; CHET, I. β-(1,3)-glucanase activity and quantity of fungus in relation to *Fusarium* wilt in resistant and susceptible near-isogenic lines of muskmelon. **Physiological Plant Patholology**, v. 14, p. 47-55, 1979.

NEUENSCHWANDER, U.; FRIEDRICH, L. Activation of plant disease resistance. In: ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS. **Aspects of applied biology 42**: Physiological responses of plants to pathogens. Dundee: Association of applied biologists, 1995. p. 217: 225.

NEUENSCHWANDER, U; VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; UKNES, S.; KESSMANN, H., RYALS, J. Is hidrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? **The Plant Journal**, v. 8, n. 2, p. 227-233, 1995.

OLIVEIRA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Papilla formation and peroxidase activity in *Mimosa scabrella* hipocotyls inoculated with the non-pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 195-197, 1997.

OSUMA, J.A.; MORO, J.R. **Produção e melhoramento do milho**. Jaboticabal : FUNEP, 1995. 276 p.

OSWALD, W.F.; SHAPIRO, J.P.; Mc DONALD, R.E.; NIEDZ, R.P.; MAYER, R.T. Some citrus chitinases also pocess chitosanase activities. **Experientia**, v. 49, p. 888-892, 1993.

PAN, S.Q.; YE, X.S.; KUĆ, J. Directa detection of β-1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 136-140, 1989.

PAN, S.Q.; YE, X.S.; KUĆ, J. Induction of chitinases in tobacco plants systemically protected against blue mold by *Peronospora tabacina* or tobacco mosaic virus. **Phytopathology**, v. 88, p. 119-123, 1992.

PANNIZI, R.C.; FERNANDES, N.G. Doenças do sorgo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. v. 2, cap. 63, p. 676-689.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In: LUZ, C.W.; FERNANDES, J.M.C.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. (Ed.) **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Revisão Anual de Patologia de Plantas, 1994. v. 2, p. 1-51.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417- 453.

PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, A.R. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculation with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 507-514, 1986.

PATYKOWSKI, J.; URBANEK, H.; KACZOROWASKA, T. Peroxidase activity in leaves of wheat cultivars differing in resistance to *Erysiphe graminis* DC. **Journal of Phytopathology**, v. 122, p. 126-134, 1988.

PAUL, C.L. **Agronomia del sorgo**. Patancheru: ICRISAT, 1990. 301 p.

PENA-CORTES, H.; SANCHEZ-SERRANO, J.J.; MERTENS,R.; WILLMITZER, L.; PRAT, S. Abscisic acid is envolved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 9851- 9855, 1989.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. (Ed.) **Manual de fitopatologia**:

doenças das plantas cultvadas. 3. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. v. 2, cap. 52, p. 538-555.

PHAFF, H.J. Enzymatic yeast cell wall degradation. **Advances in Chemistry Series**, v. 160, p. 244-282, 1977.

PICCININ, E. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* na proteção de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) e eucalípto (*Eucaliptus* spp) contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos. Piracicaba, 1995. 107p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PITTA, G.U.E. Situação da cultura do sorgo no Brasil. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Relatório anual:** 1985-1987. Sete lagoas, 1991, p. 9- 14.

POLLOCK, C.J.; DRYSDALE, R.B. The role of phenolic compounds in the resistance of tomato cultivars to *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology Zeitschrift,** v. 86, p. 56-66, 1976.

POOVAIAH, B.W.; REDDY, A.S.N.; McFADDEN, J.J. Calcium messenger system: role of protein phosphorylation and inositol bisphospholipids. **Physiologia Plantarum**, v. 69, p. 569-573, 1987.

POWER, D.M.; CHALLINOR, S.W. The effects of inositol-deficiency on the chemical composition of yeast cell wall. **Journal of General Microbiology**, v. 55, p. 169-176, 1969.

RATHMELL, W.G. Phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity in relation to phytoalexin biosynthesis in infected hipocotyls of *Phaseolus vulgaris*. **Physiological Plant Pathology,** v. 3, p. 259-264, 1973.

REGLINSKI, T.; LYON, G.D.; NEWTON, A.C. Assessment of the control of barley powdery mildew in the field. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 101, p. 1-10, 1994.

REGLINSKI, T.; LYON, G.D.; NEWTON, A.C. The control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce using elicitors extracted from yeast cell walls. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 102, p. 257-266, 1995.

REIMERS, P.J.; LEACH, J.E. Race specific resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* confered by blight resistance gene Xa-10 in rice (*Oryza sativa*) involves accumulation of a lignin-like substance in host tissues. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, p. 39-55, 1991.

REUVENI, R. Biochemical markers for disease resistance. In: SINGH, R.P.; SINGHI, U.S. (Ed.) **Molecular methods in plant pathology**. London: CRS Press, 1995. p. 99-130.

REUVENI, R.; BOTHMA, G.C. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaerotheca fuliginea* in melons. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 114, p. 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**, v. 112, p. 193-197, 1985.

REUVENI, R.; SHIMONI, M.; CRUTE, R.I. An association between high peroxidase activity in lettuce (*Lactuca sativa*) and field resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*). **Journal of Phytopathology**, v. 132, p. 312-318, 1991.

REUVENI, R.; SHIMONI, M.; KARCHI, Z. A rapid assay for monitoring peroxidase activity in melons as a marker for resistance to *Pseudoperonospora cubensis*. **Journal of Phytopathology**, n. 129, p. 333-338, 1990.

ROBINSON, P.M.; PARK, D. Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 49, p. 639-649, 1966.

RONCATTO, M.C.; PASCHOLATI, S.F. Mesocótilos estiolados de sorgo: bioensaio para a caracterização de frações de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas na proteção de sorgo contra fungos. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 6., São Paulo, 1993. **Resumos**. São Paulo: Instituto Biológico, 1993. p. 31.

ROSE, A.H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 74, n. 22, p. 110S-118S, 1993.

ROSS, A.F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v. 14, p. 340-358 , 1961.

ROULIN, S.; BUCHALA, A.J. The induction of 1,3-β-glucanases and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. **Physological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 471-489, 1995.

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

RYALS, J.; UKNES, S.; WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 104, p. 1109-1112, 1994.

RYAN, C.A. Oligosaccharide signaling in plants. **Annual Review of Cell Biology**, v. 3, p. 295-317, 1987.

RYAN, C.A.; FARMER, E.E. Oligosacharide signals in plants: A current assessment. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 651-674, 1991.

SANHUEZA, R.M.V. Práticas agrícolas e sua influência no controle biológico de doenças. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2, Piracicaba, 1987. **Anais**. Piracicaba, 1987. p. 31-35.

SAUNDERS, B.C.; HOLMES-SIEDLE, A.G.; STARK, B.P. **Peroxidase**: the properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Washington: Butter Worths, 1964. 264 p.

SCHÖNBECK, F.; DEHNE, H.W. Use of microbial metabolites inducing resistance against plant pathogens. In: FOKKEMA, N.J.; Van der HEUVEL, J. (Ed.) **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p. 363-375.

SCHOTTENS-TOMA, I.M.J.; DeVITTI, P.J.G.M. Purification and primary structures of a necrosis-inducing peptide from the apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvun* (syn. *Fulvia fulva*). **Physiological and Moleculat Plant Pathology,** v. 33, p. 59-67, 1988.

SEEVERS, P.M.; DALY, J.M.; CATEDRAL, F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance of wheat to stem rust disease. **Plant Physiology**, v. 48, p. 353- 360, 1971.

SEQUEIRA, L. The acquisition of resistance by prior inoculation. In: DALY, J.M.; URITANI, I. (Ed.) **Recognition and specificity in plant host**: parasite interactions . Tokyo: Science Society, 1979. p. 231-251.

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

SHARP, J.K.; VALENT, B.; ALBERSHEIM, P. Purification and partial characterization of a β- glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. **Journal of Biological Chemistry,** v. 259, p. 11312- 11320, 1984.

SHAUL, O.; ELAD, Y. Peroxidase and pathogenicity: related proteins in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. In: ASSOCIATION OF APPLIED BIOLOGISTS. **Aspects of applied biology 42**: physiological responses of plants to pathogens. Dundee: Association of applied biologists, 1995. p. 285-291.

SHIMONI, M. ; BAR-ZUR, A.; REUVENI, R. The association of peroxidase activity and resistance of mayze to *Exserohilum turcicum*. **Journal of Phytopatology**, v. 131, p. 315-321, 1991.

SILVA, S.R. Aspectos do controle da antracnose em plantas de milho (*Zea mays* L.), mantidas em casa-de-vegetação, pelo emprego de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Piracicaba, 1989. 81p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Zeitschrift für Pflanzenkrankleinten und Pflanzenschutz**, v. 99, n. 2, p. 159-167, 1992.

SMITH, J.; HAMMERSCHMIDT, R. Comparative study of acid peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. **Physiological and Molecular Plant Pathology,** v. 33, p. 255-261, 1988.

STACKMAN, E.C. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. **Journal of Agricultural Research**, v. 4, p. 191-200, 1915.

STAHMANN, M.A.; DEMOREST, D.M. Changes in isozymes of host and pathogen following some fungal infections. **Symposia Biologica Hungarica**, v. 13, p. 355-365, 1972.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plantas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, v. 20, n. 1, p. 16- 21, 1994.

STERMER, B.A.; HAMMERSCHIMDT, R. Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidase activity in cucumbers. **Physiological Plant Pathology**, v. 15, p. 239-249, 1984.

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

SURLÍ, J.A.; LASTRES, N.; RIVERA, M. Actividad de las peroxidases en plantas de *Phaseolus vulgaris* infectadas con el virus del mosaico común del frijol (BCMV). **Ciencias de la Agricultura**, v. 9, p. 61-70, 1981.

SWEGLE, M.; KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S. Properties of barley seed chitinases and release of embryo-associated isoforms during early stages of imbibition. **Plant Physiology,** v. 99, p. 1009-1014, 1992.

THORPE, J.R.; HALL, J.L. Chronology and elicitation of changes in peroxidase and phenylalanina ammonia-lyase activities in wounded wheat leaves in response to inoculation by *Botrytis cinerea*. **Physiological Plant Pathology**, v. 25, p. 262-379, 1984.

TOKESHI, H. Doenças de flores e plantas ornamentais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FLORES E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1. Atibaia, **Anais.** Atibaia, 1992. p. 3-4.

TUZUM, S.; KUĆ, J. A modified technique for inducing systemic resistance to blue mold and increasing growth in tobacco. **Phytopathology**, v. 75, n. 10, p. 1127-1129, 1985.

UKNES, S.; WINTER, A.M.; DELANEY, T.; VERNOOIJ, B.; MORSE, A.; FRIEDRICH, L.; MYE, G.; POTTER, S.; WARD, E. and RYALS, J. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 6, p. 692-698, 1993.

UMEMOTO, N.; KAKITANI, M.; IWAMATSU, A.; YOSHIKAWA, M.; YAMAOKA, N.; ISHIDA,I. cDNA cloning and characterization of a soybean β-glucan-elicitor receptor. In: VIII INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT MICROBE INTERACTIONS, Knoxville, 1996. **Resumos**. Knoxville: International Society Plant-Microbe Interactions, 1996. p.C-6

URITANI, I.; OBA, K. The tissue slice as a model for studies of host-parasite relationships. In. KHAL, G. (Ed.) **Biochemistry of wounded plant tissues**. Berlin: Walter de Gryter, 1979. p.287-308.

VAN HUYSTEE, R.B. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 38, p. 205-217, 1987.

VAN LOON, L.C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology,** v. 4, p. 111-116, 1985.

VAN LOON, L.C. The significance of changes in peroxidase in diseased plants. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, TH., (Ed.) **Molecular and physiological aspects of plant peroxidase**. Geneva: Imprimierie Nationals, 1986. p. 405-418.

VAN LOON, L.C.; VAN KAMMENEN, A. Polyacrilamide disc eletrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun"and "Samsun NN" changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology,** v. 40, p. 199-211, 1970.

VANCE, C.P.; ANDERSON, J.O.; SHERWOOD, R.T. Soluble and cell wall peroxidase in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. **Plant Physiology**, v. 57, n. 6, p. 920-922, 1976.

VANCE, C.P.; KIRK, T.K.; SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

VEECH, J.A. Localization of peroxidase in *Rhyzoctonia solani*-infected cotton seedlings. **Phytopathology,** v. 66, p. 1072-1076, 1976.

VEIGA, A.C. Aspectos econômicos da cultura do sorgo. **Informe Agropecuário**, v. 12, n.144, p. 3-9, 1986.

VERHAAR, M.A.; HIJWEGEN, T.; ZADOKS, J.C. Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by the mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugulosa*. **Biological Control**, v. 6, n. 3, p. 353-360, 1996.

VERNOOIJ, B; FRIEDRICH, L; AHL-GOY, P.; STAUB, T.; KESSMANN, H.; RYALS, J. 2.6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 228-234, 1995.

VIANA, A.C.; BORGONOVI, R.A. ; FREIRE, F.M. Alternativas de cultivo para a exploração do sorgo granífero. **Informe Agropecuário**, v. 12, n. 144, p. 28-31, 1986.

VIGERS, A. J.; ROBERTS, W.K.; SELITRENNIKOFF, C.P. A new family of plant antifungal proteins. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 4, n. 4, p. 315-323, 1991.

VÖGELI, U.; MEIS, F.; BOLLER, T. Co-ordinated regulation of chitinase and β-1,3-glucanse in bean leaves. **Planta**, v. 174, p. 364-372, 1988.

VUKOVIC, R.; HUNDINA-DOMLADOVEC, M.; MRSA, V. Molecular organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Prehrambeno-Technology Review**, v. 32, n.2-3, p. 99-102, 1994.

WAGIH, E.E. Stress protein and isozymology of acid phosphatase, esterase, and peroxidase in *Phaseolus vulgaris* following peanut mottle virus infeccion. **Journal of Phytopathology**, v. 139, p. 157-164, 1993.

WANG, X.; ZAFIAN, P.; CHOUDHARY, M.; LAWTON, M. The PR5K receptor protein kinase from *Arabdopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. **Proceedings of the National Academy of Science**, n. 93, p. 2598-2602, 1996.

WARD, E.R.; UKNESS, S.J.; WILLIAMS, S.C; DINCHER, S.S.; WIDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.P.; RYALS, J. A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **Plant Cell**, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WARD, E.W.B. Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi. In: BAILEY, J.A. (Ed.) **Biology and molecular biology of plant- pathogen interactions**. Ilminster: Springer- Verlag, 1986. p. 107- 131.

WARD, H.M. Recent researches on the parasitism of fungi. **Annals of Botany**, v. 19, p. 1-54, 1905.

WHETZEL H.H. The terminology of phytopathology. **Proceeding of International Congress on Plant Sciences**, v. 2, p. 1204-1215, 1929.

WHETZEL, H.H. HESLER, L.R.; GREGORY, C.T.; RANKIN, W.H. **Laboratory Outlines in Plant Pathology**. Philadelphia: W.B. Sauders, 1925. 231p.

WILLIAMS, D.L.; MACNAME, R.B.; JONES, E.L.; PRETUS, H.E.E.; BOWDER, E.W.; LUZIO, N.R. A method for the solubilization of a (1-3) β-D-glucan isolated from *S. cerevisiae*. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 203-213, 1991.

WILLIAMSON, M. A.; FOKKEMA, N.J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from appressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Netherlands Journal of Plant Pathology,** v. 91, p. 265- 276, 1985.

WIRTH, S.J.; WOLF, G. A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 12, p. 197-205, 1990.

WUBBEN, J.P.; EIJKELBOOM. C. A.; WIT, P.J.G.M. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the epiderms of tomato leaves infected by *Cladosporium fulvum.* **Netherlands Journal of Plant Patology**, v. 99, supl. 3, p. 231-239, 1993.

YE, X.S.; PAN, S.Q.; KUĆ, 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**, v. 80, p. 1295-1299, 1990.

YOUNG, D.H.; KAUSS, H. Release of calcium from suspension cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability. **Plant Physiology**, v. 73, p. 698- 702, 1983.

YOUNG, D.H.; PEGG, G.F. Purification and characterization of 1,3-β-glucano hydrolases from healthy and *Verticillium albo-atrum* infected tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, n. 19, p 391- 417, 1981.