



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

LOUISE MELO DE SOUZA OLIVEIRA

**INDUÇÃO ABIÓTICA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CANA-DE-AÇÚCAR
RELACIONADAS À DEFESA CONTRA *Sporisorium scitameneum***

Recife
2012

LOUISE MELO DE SOUZA OLIVEIRA

**INDUÇÃO ABIÓTICA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CANA-DE-AÇÚCAR
RELACIONADAS À DEFESA CONTRA *Sporisorium scitameneum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife
2012

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Oliveira, Louise Melo de Souza

Indução abiótica de genes de resistência em cana-de-açúcar relacionadas à defesa contra *Sporisorium scitamineum* / Louise Melo de Souza Oliveira. – Recife, 2012.

39 f.: il.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.

Inclui referências

1. Cana-de-açúcar 2. Pragas agrícolas - Controle I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Título.

663.61

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-412

**INDUÇÃO ABIÓTICA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CANA-DE-AÇÚCAR
RELACIONADAS À DEFESA CONTRA *Sporisorium scitameneum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 24/10/2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia/ UFPE

Dra. Clébia Maria Alves de Almeida /UFPE

Dra. Luciana Melo Sartori Gurgel/ IPA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois através de seus ensinamentos pude aprender a seguir no melhor caminho, e é ele que me dá a força para tudo o que faço na minha vida.

À meus pais, Carlos Haroldo Oliveira e minha mãe Eliane Oliveira que pela educação, ensinamentos e apoio incondicional em todos os momentos e principalmente pelo meu caráter e por ser a pessoa que todos conhecem. Ao meu irmão Lucas Oliveira que além de irmão é um amigo.

Aos meus avôs, Douglas Souza que mesmo não estando mais aqui sei que continua me protegendo e cuidando de mim, e Clarisse Souza que sempre esteve ao meu lado, minha segunda mãe.

Quero agradecer a Jadson Emanuel Lopes Antunes que sempre esteve em meu lado, em momentos difíceis que passei nesses dois anos de mestrado, pelo amor, companheirismo e dedicação. Te amo.

À Profa. Dra. Márcia Vanusa, e Maria Tereza dos Santos Correia pela orientação ao longo desse e de outros trabalhos, por sua confiança, apoio, crítica e dedicação, sendo exemplos de profissionais a ser seguidos.

À Universidade Federal de Pernambuco e o Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, em nome dos servidores e funcionários, em especial Adenilda Eugenia Lima.

Ao Instituto Agrônomo de Pesquisa, por ter me recebido. Agradeço especialmente a Maria Virginia por quem tenho um sentimento especial, Dr. Rildo Sartori por ter confiado a mim o desenvolvimento deste trabalho. A Dr. Amaro Castro, Dra. Maria Luiza Basto, Dra. Adália Mergulhão, Dra. Maria do Carmo que abriram as portas do laboratório de genoma para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço em especial a Túlio Diego da Silva, pelo companheirismo e ensinamentos, me ensinou muito para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço ainda a todos do Laboratório de Biologia Molecular/ UFPE, por me acompanharem e ajudarem no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos que fora do ambiente de trabalho estão comigo Douglas Rafael, Silvana Dias, Larissa Gouveia, Andreia Carvalheira e Bruna Carvalheira. Em especial a Rhaísa Leal por ser a irmã que Deus escolheu pra mim.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso cante, chore, ria, dance e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplauso!”

Charlie Chaplin

RESUMO

Nos diferentes ambientes onde é cultivada a cana-de-açúcar, a cultura é submetida às mais diversas condições e exposta a uma ampla variedade de fatores, capazes de reduzir sua produtividade, sendo as doenças um deles. O carvão é uma das principais doenças da cana-de-açúcar que provoca a restrição do uso de variedades suscetíveis altamente produtivas. A indução de resistência consiste na ativação de mecanismos naturais de defesa das plantas contra patógenos por meio de indutores bióticos e abióticos. Este método alternativo de controle é uma proposta promissora para o controle de doenças, reduzindo a dependência aos produtos químicos e possibilitando, em algumas culturas, a utilização de cultivares com alto potencial agrícola e reduzida resistência a determinadas doenças. A expressão de genes e proteínas de resistência tem sido usada como uma importante abordagem experimental para conhecer função gênica e compreender os mecanismos moleculares que estão relacionados com processos de tolerância. A técnica de Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) é uma ferramenta útil na identificação de genes de defesa em plantas a estresse biótico. Este trabalho teve como objetivo analisar a diferença de expressão de genes e proteínas em cana-de-açúcar induzidas com elicitores abióticos para controle do carvão utilizando a técnica RT-PCR. Plantas da variedade SP 791011 (suscetível) com três meses de idade foram tratadas com: ASM (10 g do p.c./ 100 litros de água); Silicato de potássio (24g/l), Extrato alcoólico de *Allamanda blanchetti* (1000ppm) e plantas controle, não tratadas tiveram seus tecidos coletados com 0, 24, 48 e 72 horas após a indução de resistência e imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido para a extração de RNA e proteínas totais, os quais foram extraídos da folha utilizando o reagente Trizol e o cDNA obtido utilizando o Kit SuperScriptII. Foram desenhados primers de genes de resistência da cana-de-açúcar ao carvão, e realizada a análise de expressão. As proteínas totais foram extraídas, solubilizadas e separadas por eletroforese bidimensional (2-DE) para posterior identificação via espectrometria de massas. Foram observadas mudança de expressão gênica e protéica nos diferentes tratamentos, principalmente na expressão dos genes de quitinase, glucanase e peroxidase. Foi possível verificar a eficiência dos diferentes indutores de resistência e estes resultados são muito úteis para ajudar a elucidar a base molecular dos mecanismos que as plantas utilizam para tolerar a presença de fungos fitopatogênicos.

Palavras-chave: *Saccharum* sp. Carvão da cana-de-açúcar. Resistência induzida. Expressão gênica.

ABSTRACT

In different environments where it is grown in sugar cane, the culture is subjected to various conditions and is exposed to a wide variety of factors that can reduce productivity, illness being one of them. Coal is a major disease of cane sugar that causes the restriction of the use of susceptible varieties highly productive. The induction of resistance is the activation of natural defense mechanisms of plants against pathogens through biotic and abiotic inducers. This alternative method of control is a promising proposal for the control of diseases, reducing dependence on chemicals and allowing, in some cultures, the use of cultivars with high agricultural potential and reduced resistance to certain pathogens. The expression of resistance genes and proteins has been used as an important experimental approach to gene function knows and understand the molecular mechanisms that are related to processes tolerance. The Reverse Transcription Poylemrse Chain Reaction (RT-PCR) technique has been effective in the idetification of defense genes in plants to biotic stress. This study aimed to analyze the difference in expression of genes and proteins in sugarcane induced with abiotic elicitors to control coal using RT-PCR technique. Plants of the variety SP 791011 (susceptible) with three months of age were treated with: ASM (10 g pc / 100 liters of water); Potassium silicate (24g / l), alcoholic extract of Allamanda blanchetti (1000ppm) and control plants Untreated their tissues were collected with 0, 24, 48 and 72 hours after induction of resistance and immediately stored in liquid nitrogen for RNA extraction and total proteins, which were extracted from the leaf using the Trizol reagent and the cDNA Kit obtained using SuperScriptII. Primers were designed for resistance genes from sugar cane to coal, and performed expression analysis. The total protein were extracted, solubilized and separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE) for identification via mass spectrometry. We observed a change in gene and protein expression in the different treatments, especially in the expression of genes for chitinase, glucanase and peroxidase. It was possible to verify the effectiveness of different inducers of resistance and these results are very useful to help elucidate the molecular basis of the mechanisms that plants use to tolerate the presence of pathogenic fungi.

Key-words: Saccharum sp. Sugarcane smut. Induced resistance. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- O meristema escuro na região central é chamado de chicote, principal sintoma provocado pelo carvão da cana-de-açúcar.	14
Figura 2 -Esporos de resistência de <i>S. scitamineum</i> , visto através de microscópio eletrônico de varredura.	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequencia de primers utilizadas para amplificação dos genes PR e suas temperaturas de anelamento (TA) respectivamente.	36
Tabela 2 - Perfil fitoquímico do extrato orgânico das folhas de <i>Allamanda blanchetti</i>	36
Tabela 3 - Expressão de pr genes da cana-de-açúcar (suscetível à doença do carvão) em resposta à indução com extrato de ASM (acilbenzolar-S-metil) e <i>A. blanchetti</i> em 24 e 48 horas após a indução.....	37

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	11
INTRODUÇÃO	12
1.1 CARVÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	13
1.2 INDUÇÃO A RESISTÊNCIA	15
1.2.1 Acibenzolar-s-metil (ASM).....	17
1.2.2 <i>Allamanda blanchetti</i>	17
1.3 . ESTUDOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO CARVÃO- CANA-DE-AÇÚCAR .	18
1.4 OBJETIVO.....	19
1.4.1 Objetivos específicos	19
REFERÊNCIAS.....	20
CAPÍTULO 2.....	26
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA SISTÊMICA EM CANA-DE-AÇÚCAR-AÇÚCAR COM EXTRATO DE FOLHA DE <i>ALLAMANDA BLANCHETTI</i> CONTRA <i>SPORISORIUM SCITAMINEUM</i>	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E METÓDO.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	33
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS.....	33
TABELAS	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	38

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

INTRODUÇÃO

A cana –de- açúcar é uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*. É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia, sendo a maioria das cultivares comerciais originárias do cruzamento interespecífico de *Saccharum officinarum* com outras espécies do gênero, tais como *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barbieri* e *S. edule* (SACIOTO, 2003). A cultura foi introduzida no Brasil no período colonial, quando seu valor na Europa era tão alto quanto o ouro, mas foi na zona da mata de Pernambuco que a lavoura da cana se expandiu com sucesso (MAPA, 2012), um dos motivos para esse desenvolvimento é o clima, pois as condições climáticas do país são favoráveis para a fisiologia deste vegetal.

Além do consumo para alimentação, existe a utilização com combustível, na forma de etanol. O caldo extraído da cana-de-açúcar é matéria- prima para a fabricação de etanol, o processo de obtenção do caldo exige cuidados, pois em geral, é um meio bastante favorável ao desenvolvimento de microrganismos, tomados cuidados de assepsia, desde a moagem. (ANDRADE et al 2009).

A cana-de-açúcar ocupa cerca de 8 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do País, que é o maior produtor mundial, seguido por Índia, Tailândia e Austrália. Os maiores produtores por ordem crescente é São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Paraná, Alagoas, Mato Grosso do Sul e Pernambuco. (CONAB, 2011).

Esta cultura volta ao cenário nacional devido ao desenvolvimento dos biocombustíveis. Hoje o etanol proveniente da cana é responsável por metade da frota de carros leves no Brasil. A grande maioria dos automóveis vendidos anualmente pode funcionar tanto em etanol como gasolina, sendo que o país adiciona ainda 25% de etanol à gasolina. O etanol de cana-de-açúcar ajuda ainda o país a ter quase metade da sua energia proveniente de fontes renováveis. (ROMERO, 2009).

As doenças de plantas constituem uma das principais causas que limitam os rendimentos das culturas e a qualidade dos produtos. Foram identificadas 216 doenças que atingem a cana-de-açúcar, sendo que cerca de 58 foram encontradas no Brasil. Dentre estas doenças, pelo menos dez podem ser consideradas de grande importância econômica para a cultura (EMBRAPA, 2012). Com relação as doenças provocadas por fungo destacam- se a ferrugem e o carvão, pelos danos causados na plantação (YOU-XIONG et al, 2011).

1.1 CARVÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Nome científico: *Sporisorium scitamineum* M. Piepenbring (2002).

Sinônimo: *Ustilago scitaminea* Sydow 1927

Nome vulgar: carvão da cana- de- açúcar

Sintoma: chicote escuro formado por esporos

O carvão teve seu primeiro relato em Natal, na África no Sul em 1877 (ANTOINE, 1961). O primeiro registro no continente Americano foi na província de Tucumán, na Argentina, em 1940 (HIRSCHHORN, 1949) e disseminou para o Paraguai em 1944 (JAMES, 1973) e para o Brasil em 1946 (VEIGA, 1972). Em pouco tempo já se encontravam registros em diversos Estados brasileiros, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, sul de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Em 1985 o patógeno chegou até o Nordeste, no município de Cascavel no Ceará. No ano seguinte, novas regiões foram atingidas pelo fungo, tendo a doença alcançado a região central de Goiás e Bahia (COPERSUCAR, 1987).

Na década de 80 observou-se a ocorrência do surto do Carvão no Brasil, na época, a doença somente foi controlada com a substituição das variedades. Essa doença está sendo disseminada no mundo existe em 64 países, provocando perdas econômicas de até 100% da plantação além da substituição por variedades mais resistentes. (CHINEA; RODRÍGUEZ, 2010; NZIOKI et al 2010).

A diminuição na produtividade é provocada por um conjunto de fatores, que incluem: eliminação das plantas infectadas, redução no diâmetro e desenvolvimento dos colmos, redução dos perfilhos industrializáveis e perdas do teor de sacarose pelo aumento de fibra e conseqüente menor extração de açúcar (LEE-LOVICK, 1978; FERREIRA, 1989; CASAGRANDE, 1998).

O agente causador da doença foi descrito como *Ustilago scitaminea* Sydow (SYDOW, 1927), um fungo da Divisão Basidiomycota, Classe Ustilaginomycetes, Ordem Ustilaginales, Família Ustilaginacea (HAUKSWORTH et al 1995). No entanto recentemente através de estudos moleculares utilizando as regiões ITS (sequência conservada do DNA de espécies de fungo) foi sugerido por Piepenbring et al (2002) a reformulação do nome para *Sporisorium scitamineum*, mas como criou controvérsia entre os fitopatologistas do mundo todo, e alguns trabalhos publicados após essa alteração ainda mantém a denominação anterior (BUENO, 2010).

S. scitamineum, como todas as espécies do gênero, é parasita de tecidos meristemáticos, penetrando por hifas dicarióticas no hospedeiro através de tecidos não diferenciados da parte basal das gemas ou pela base das primeiras folhas emergentes (TOKESHI; RAGO, 2005). A entrada no meristema de gemas ocorre entre 6 e 36 h após a deposição de teliosporos. Hifas são encontradas em toda a planta principalmente nas células parenquimáticas em direção aos entrenós inferiores. Nos entrenós superiores, as hifas são progressivamente construídas formando o chicote (massa de esporos). A primeira aparição do chicote apical (Figura 1) ocorre com cerca de 120 dias do plantio, com esse sintoma uma enorme quantidade de teliosporos (Figura 2) são formados e estes são responsáveis por infectar as gemas terminais e laterais na cultura que cresce rapidamente (TOKESHI; RAGO, 2005; SUNDAR et al 2012).

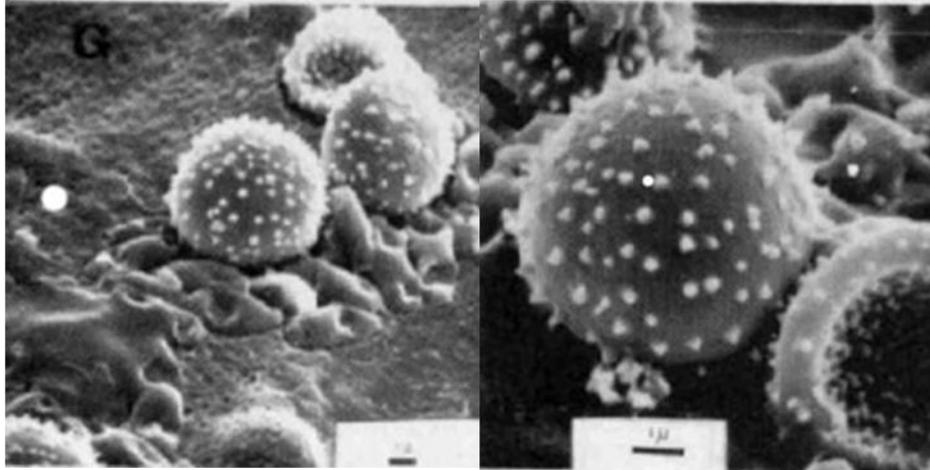
As gemas por serem a porta de entrada da infecção, possuem um papel crucial na interação patógeno - hospedeiro. Gemas dormentes têm uma maior resistência à infecção, por causa de sua estrutura, o contrário ocorre em gemas que já se encontram em processo de brotação, pois existe um espaço entre as escamas para facilitar a entrada de hifas infectivas (BUENO, 2010).

Figura 1- O meristema escuro na região central é chamado de chicote, principal sintoma provocado pelo carvão da cana-de-açúcar.



Fonte: EMBRAPA (2012)

Figura 2 -Esporos de resistência de *S. scitamineum*, visto através de microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: INIA(2012)

A melhor forma de controle da doença ainda é o uso de variedades resistentes (CHEN et al, 2012), no entanto não são as melhores economicamente com relação à produção de açúcar e etanol.

O melhoramento genético visando resistência à doença tem sido complicado pelo surgimento frequente de novas variantes patogênicas, que dominam as variedades resistentes. Mesmo agora, o benefício de tais variedades não poderia ser aproveitado para maximizar a produtividade da cana, em virtude de sua extrema suscetibilidade a outras doenças importantes, como a podridão vermelha e ferrugem (SUNDAR et al 2012).

1.2 INDUÇÃO A RESISTÊNCIA

O controle químico realizado por meio da aplicação de fungicidas é o mais empregado nas usinas por causa do seu efeito rápido. Entretanto alguns problemas quanto ao uso indiscriminado, ou a não alternância dos produtos aplicados podem induzir a resistência de patógenos aos fungicidas (GOMES, 2011).

Segundo Cavalcanti et al (2005) a indução de resistência é o aumento do nível de resistência através de indutores (agentes externos) sem modificação no genoma, o qual ocorre de maneira não específica, ativando genes que vão codificar respostas de defesa na planta. Barreiras físicas e bioquímicas pré-formadas representam a primeira linha de defesa contra a maioria dos fitopatógenos. No entanto, ao superar essas defesas, os patógenos encontram mais um obstáculo, pois o reconhecimento do microrganismo pelos receptores presentes na parede

celular dos vegetais é responsável pela ativação de uma cascata de respostas contra a invasão dos agentes patogênicos (DAVID et al, 2010).

Alternativas de controle da doença através da ativação de mecanismos estão sendo estudadas. Uma das formas é a utilização dos agentes elicitores para promover uma resistência sistêmica adquirida (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Vários agentes induzem a produção de sinais no vegetal, permitindo proteção contra fitopatógenos.

O processo de indução de resistência é iniciado quando um sinal externo (elicitor) que se liga a um possível receptor na superfície da célula vegetal e através dele o sinal primário é transmitido para o interior da célula, ativando os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam a expressão de genes específicos, determinando o desenvolvimento de interações que podem ser compatíveis, ou seja, a planta apresenta a doença, ou incompatíveis quando essa planta apresenta resistência (LEITE et al, 1997).

Os indutores de resistência em vegetais podem ser classificados em bióticos e abióticos, de acordo com seu modo de ação indutora. Os chamados indutores bióticos são organismos vivos, ou partes dos mesmos, que proporcionam processos de defesa, com ação sistêmica ou localizada nos vegetais. Os indutores abióticos podem ser moléculas sintéticas que mimetizam o sinal do patógeno, ativando genes relacionados à defesa, aumento na produção de metabolitos secundários como compostos fenólicos, fitoalexinas e o ácido salicílico, ou ainda ferimentos, estresses por temperatura, radiação UV ou salinidade (ATHAYDE-SOBRINHO et al, 2005).

Diversos autores já mostraram que as plantas podem ser induzidas a adquirirem resistência por meio de compostos bioativos presentes em: extratos de plantas (STARGARLIN et al, 1999; BETTIOL; STADNIK, 2000; ARAUJO; MENEZES, 2009), exopolissacarídeos bacterianos (CASTRO; BACH, 2004), rizobactérias promotoras de crescimento (PIETERSE; VAN LOON, 1999; VISWANATHAN; SAMIYAPPAN, 2002), preparações de leveduras (STADNIK; BETTIOL, 2000; ZANARDO et al, 2009) e raças avirulentas de patógenos (MONOT et al. 2002). Além destes, diversos produtos químicos podem ativar mecanismos de defesa em plantas e, dentre estes, podem ser citados o silício (POZZA et al, 2004), ácido salicílico (HWANG et al, 1997), quitosana (SATHIYABAMA; BALASASUBRAMANIAN, 1998), fosfato de potássio (BÉCOT et al, 2000), acibenzolar-S-metil (ASM) (GORLACH et al, 1996; DIETRIH et al, 2005; ARAUJO; MENEZES, 2009; DANNER, 2008), ácido jasmônico (BALDWIN, 1998; CIPOLLINII, 2002) e metil jasmonato (HEIJARI et al, 2005).

1.2.1 Acibenzolar-s-metil (ASM)

O ASM é o Ester-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-triazole-7-carbotióico, o qual é conhecido comercialmente é conhecido como Bion® Actigard®. Vários estudos apontam o Acibenzolar-S-metil como um dos mais promissores indutores de resistência. O ASM é um dos elicitores mais utilizados no controle de doenças de plantas por meio da indução de resistência, pois é um produto de baixa toxicidade e sistêmico, com rápida absorção e translocação na planta (OOSTENDORP et al, 2001).

O ASM pode ser enquadrado na definição de um indutor de resistência, pois fornece proteção a um amplo espectro de patógenos, mas não possui propriedades antimicrobianas, iniciando o aumento na resistência às doenças em muitas espécies de plantas, pela sua ação semelhante ao ácido salicílico na via de transdução do sinal que leva à resistência adquirida (BRITO, 2009)

Muitos autores apontam uma ação rápida seguida de uma degradação na mesma velocidade, entretanto em algumas culturas como em cacau um período de ação do ASM de 15 dias após sua aplicação nas plantas, período considerado longo. Em virtude desta ação, vários trabalhos estão sendo desenvolvidos demonstrando a eficácia do ASM na indução de resistência nas plantas como em pimentão, tomate batata, fumo, trigo, bananeira, feijão, cacau, berinjela (VALLAD; GODMAN, 2004; GUIMARÃES, 2007; SILVA, 2007; HUANG, 2012)

1.2.2 *Allamanda blanchetti*

Nome científico: *Allamanda blanchetti*, A. DC

Sinônimo: *Allamanda violaceae* (Gardner e Fielding)

Nomes vulgares: alamanda roxa, alamanda rosa, alamanda de jacobina

Fenologia: floresce na primavera e verão

Área de dispersão: cultivada em todos os países tropicais. No Brasil é encontrada em quase todo litoral e zonas quentes do país

No Nordeste do Brasil a vegetação do bioma caatinga constitui um dos mais altos níveis de ameaça de extinção à sua fauna e flora, e com grande potencial terapêutico. O controle de doenças de plantas é frequentemente realizado com fungicidas, os quais,

utilizados de forma excessiva podem causar sérios riscos à saúde humana e contaminação do meio ambiente, além dos possíveis problemas de resistência de fitopatógenos. Torna-se necessária a busca por métodos alternativos de controle de doenças que causem menos impacto ao meio ambiente e seja eficiente no manejo de doenças. (GARCIA et al, 2012).

Dentre as principais famílias de plantas em estudo, a família Apocynaceae destaca-se pelo grande número de gêneros. Uma característica da família Apocynaceae é que todas as espécies produzem seiva leitosa. No Brasil, o gênero *Allamanda* compreende 10 espécies (JOLY, 1975), que são reconhecidas pela produção de princípios ativos, dentre os quais se destacam os iridóides (ANDERSON; CHANG; McLAUGHLIN, 1988). Para Coppen (1983) plantas do gênero *Allamanda* apresentam uma vasta atividade biológica, inclusive contra algas. Estudos com extratos de plantas de *Allamanda* registraram compostos antifúngicos (TIWARI; PANDEY; DUBEY, 2002) e atividade antitumoral sobre células em cultura (NAVARRO SCHMIDT et al. 2006).

1.3 . ESTUDOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO CARVÃO- CANA-DE-AÇÚCAR

Devido ao grande problema econômico causado por essa doença, a busca por novas tecnologias, como as técnicas de biologia molecular, auxiliam na identificação de genes de resistência. As plantas susceptíveis são capazes de ativar suas defesas, no entanto fazem tardiamente, ou seja, quando já estão infectadas com o patógeno (LA O et al 2011). Devido a isto, estudos para induzir essas defesas antes da invasão do patógeno são necessários para que a planta, mesmo que susceptível não seja infectada.

As Proteínas-PR (“pathogenesis-related proteins”) são proteínas induzíveis relacionadas à interação planta-patógeno. São classificadas em 17 famílias, primeiro foram classificadas de acordo com suas características durante a situação patológica, depois foi visto que mesmo sem a presença do patógeno elas são encontradas (SILVA et al, 2008).

O acúmulo de PRs é utilizado na planta resistente para degradar diretamente as paredes celulares do patógeno e inibir o crescimento e disseminação (ELVIRA et al. 2008, BOAVA et al. 2010). Dentre as proteínas PR mais estudadas estão as quitinases e as β -1,3 glucanases. Essas duas enzimas têm atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes na parede dos patógenos. A atividade dessas enzimas é aumentada quando plantas são tratadas com elicitores de respostas de defesa ou indutores de resistência (SILVA et al, 2008).

O-Hechavarría et al (2011) estudando a interação entre a planta e o patógeno observou a expressão de sequências gênicas as quais estavam presentes em plantas resistentes ao patógeno e ausente em plantas susceptíveis, dentre elas as proteínas da classe PR-2, PR-3 e PR-5.

LA O et al (2008) observou que a resistência da cana-de-açúcar estava diretamente relacionada à expressão de PR 1 , 2, 3, 5. Estes resultados também foram encontrados por Heinze et al. (2001) e Borrás et al. (2005). Que et al (2011) estudando expressão de proteínas entre duas variedades susceptível e resistente, observou 20 proteínas diferencialmente expressas e através de ferramentas de bioinformática observou que possuíam as seguintes funções: fotossíntese, transdução de sinal e resistência a doenças. O gene NPR1, é o regulador da resposta de defesa tanto em resistência sistêmica adquirida, quanto na induzida, ele é necessário para a expressão de PR, através da interação com fatores de transcrição (ZANG; CAI, 2005). Chen et al (2012) observou um aumento na expressão desse gene o ScNPR1 (sequência do gene para cana-de-açúcar) e concluiu que ele estava diretamente ligado a defesa da cana-de-açúcar ao carvão.

1.4 OBJETIVO

Analisar a expressão de genes da cana-de-açúcar, após a indução de resistência, caracterizando os genes envolvidos nos mecanismos de defesa contra *Sporisorium scitamineum*.

1.4.1 Objetivos específicos

- a) Analisar o perfil fitoquímico do extrato etanólico de *Allamanda blaquetti*
- b) Analisar a expressão de genes de resistência em cana-de-açúcar envolvidos na defesa contra o carvão
- c) Comparar a expressão gênica após o uso de extrato de *A. blaquetti* e Acilbenzolar-S-metil (ASM)

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J.E.; CHANG, C.J.; MCLAUGHLIN. Bioactive components of *Allamanda cathartica*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, p. 307-308, 1988.
- ANDRADRE, E.T.; CARVALHO, S.R.G.; SOUZA, L.F. Programa do proálcool e o etanol no Brasil. **ENGEVISTA**, v. 11, n. 2. p. 127-136, 2009
- ANTOINE, R. Smut. In: MARTIN, J.P. ABBOTT, E.V., HUGHES, C.G. (Ed.). **Sugarcane diseases of the world**. Amsterdam: Elsevier, 1961. v.1, p.326-353
- ARAÚJO, F. F; MENEZES, D. , Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T. de; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: **FEALQ**, v. 13. p. 51-80, 2005.
- BALDWIN, I.T. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plant under attack in native population. **Proceedings of The National Academic Science USA**. v, 95, p 8113-8118. 1998.
- BÉCOT, S.; PAJOT, E.; LECORRE, D.; MONOT, C.; SILUE, D. Fitogard® (K2 HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, v. 19, p. 417- 425. 2000.
- BETTIOL, W.; STADNIK, M.J. Controle alternativo. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Ed.) **Oídios. Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariuna: p. 165-192 , 2000
- BOAVA, LP; KUHN OJ; PASCHOLATI, SF; DI PIERO, RM; FURTADO, EL.. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e- inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology** 35(2):124-128. 2010
- BORRÁS, O; THOMMA, BP; CARMONA, E; BORROTO, CJ; PUJOL, M; ARENCIBIA, A; LÓPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced indisea se resistant somaclones up on inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiol. and Biochem.**v. 43 p.1115-1121.2005.
- BRITO, N.M.. **Alternativas de controle da queima das folhas do inhame (*Dioscorea cayennensis*)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba - Centro de Ciências Agrárias, Areia, 103p 2009.
- BUENO, C.R.N.C. **Infecção por *Sporisorium scitamineum* em cana-de-açúcar: influência de variáveis ambientais e desenvolvimento de método para diagnose precoce** Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 68 p 2010.

CASAGRANDE, M. V. **Avaliação da incidência da doença e estimativa de danos ocasionados pelo carvão (*Ustilado scitaminea* Sydow) em variedades de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 86p. 1998.

CASTRO, O.L.; BACH, E.E. Increased production of β -1,3- glucanase and protein in *Bipolaris sorokiana* pathosystem treated using commercial xanthan gum. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 165-169. 2004.

CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S.. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ., p.81-124. 2005

CHEN, J.W.; KUANG, J.F.; PENG, G. WAN, S.B.; LIU, R.; YANG, Z.D.; DENG, H.H. Molecular cloning and expression analysis of a *npr1* gene from sugarcane Pakistan **Journal of Botany**. V 44(1):193-200p, 2012.

CHINEA, A; RODRÍGUEZ, E. Enfermedades de la caña de azúcar. 2 ed. Habana. Edición **Publica**. p 152. 2010

CIPOLLINI, D.F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia**, v. 131, p. 514-520. 2002.

CONAB Companhia Nacional de Abastecimento .**Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, janeiro/2011** Brasília : Conab 2011. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf>. Acesso em 30 de setembro de 2012

COPERSUCAR. COOPERATIVA CENTRAL DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Boletim Técnico Copersucar/1987**, Piracicaba, n.36- 87, p.23, 1987.

COPPEN, J.J.W. Iridoids with algicidal properties from *Allamanda cathartica*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 179-182, 1983

DANNER. M.A.; SASSO, S.A.Z., MEDEIROS, J.G.S.; MARCHESE, J.A.; MAZARO, S.M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.7, p.793-799, 2008.

DAVID, V.; YINONG, Y.; CASIANA, V.C.; MONICA, H.O. Abscisic Acid-Induced Resistance against the Brown Spot Pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in Rice Involves MAP Kinase Mediated Repression of Ethylene Signaling. **Plant Physiology**, v. 152, p. 2036–2052, 2010.

DIETRICH, R.; PLOSS, K.; HEIL, M. Growth responses and fitness cost after induction of pathogen resistance depend on environmental condition. **Plant Cell and Environment**, v. 28, p. 211-222. 2005

ELVIRA, M.I.; MOLINA GALDEANO, M; GILARDI, P; GARCÍA LUQUE, I; SERRA, MT. Proteomic analysis of pathogenesis related proteins (Prs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PmMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of experimental Botany**. 2008.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária **Doenças causadas por fungos**. Disponível em < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_79_22122006154841.html#>. Acesso em 15 de outubro de 2012.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Doenças da cana de açúcar**. Disponível em < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_79_22122006154841.html> Acesso em 10 de outubro de 2012.

FERREIRA; S.A., COMSTOCK, J.C. Smut. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JR.; A.G.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of Sugarcane – Major Diseases**. Amsterdam: Elsevier, p.211-229.1989.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 48- 57, . 2012

GOMES, E.C.S. **Extrato de *Allamanda blanchetti* na indução de fitoalexinas em sorgo e resistência em videira ‘Superior Seedless’ contra *Uncinula necator***. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 96p. 2011.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BETEC, G.; HENGY, BECKHOVE, U.; KARL-HEINZ, K.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, v. 8, p 620-643. 1996.

GUIMARÃES, L.M.P. **Eficiência de indutores no manejo integrado de *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus zeae* em cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidade Federal Rural de Pernambuco. 114p. 2007.

HEIJARI, J.; NERG, A.M.; KAINULAIMEN, P.; VIIRI, H.; VOURINEN, M.; HOLOPAINEN, J.K. Application of methyl jasmonate reduces growth but increases chemical defense and resistance against *Hylobius arietis* in Scots pine seedlings. **Entomologia Experimental et Applicata**. v, 115, p. 117-124. 2005.

HEINZE, B.S; THOKOANE, L.N.; WILLIAMS, C.N.; BARNES, J.M.; RUTHE-RFORD, R.S. The smut sugarcane interaction as a model system for the integration of marker discovery and gene isolation. **Proc. safr. sug. Technol. ass.** v. 75:p. 88-93. 2001

HIRSCHHORN, E. Un nuevo metodo de infeccion artificial con el carbon de la can de azucar. **Revista de Investigaciones Agrícolas**, Buenos Aires, v.4, p.335-344, 1949.

HUANG, C.H.; VALLAD, G.E; ZHANG, S.; WENA. BOTOND BALOGH, J.L.; FIGUEIREDO, F.; BEHLAU, J.B.J. Effect of Application Frequency and Reduced Rates of Acibenzolar-S-Methyl on the Field Efficacy of Induced Resistance Against Bacterial Spot on Tomato. **Plant Disease** v.96,N.2 p 221-227.2012

INIA- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas- Venezuela. **Agronomía tropical** Disponível em < http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at3116/arti/ordosgoitti_a.html > Acesso em 2 de setembro de 2012.

JAMES, G. Smut spore germination on sugarcane internode surfaces. *Proceedings of The South African Sugar Technologists Association*, Veracruz, p.179-180, 1973.

JOLY, A.B. Botânica, Introdução a Taxonomia Vegetal. São Paulo: **Editora Nacional**, 1975

LA O, M; ARENCIBIA, A; VINAGRE, F; FERNÁNDEZ, M; ACEVEDO,R; LÓPEZ, R; RODRÍGUEZ, E; HORMAZA, J; CARMONA, E; LEÓN, O; SANTANA, I. “Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports* 27(6): 1103-1111.2008

LEE-LOVICK, G. Smut of sugarcane – *Ustilago scitaminea*. **Review of Plant Pathology**, Wallingford, v.57, p.181-188, 1978.

LEITE, B.; RONCATO, L.D.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R.. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas- fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo-RS v. 5, p. 235-280.. 1997.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cana-de-açúcar**. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> > Acesso em 01 de outubro de 2012

MONOT, C.; PAJOT, E.; LECORRE, D.; SILUÉ, D. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control**, v. 24. p. 75-81. 2002.

NAVARRO SCHMIDT, D. F. N.; YUNES, R. A.; SCHAAB, E. H.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; FRANCHI-JUNIOR, G. C.; NOWILL, A. E.; CARDOSO, A. A. ; YUNES, J. A. Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of *Allamanda blanchetti* and *A. schottii* on the growth of leukemic and endothelial cells. **Journal Pharm Science**, v. 9, n. 2, p. 200-208, 2006.

NZIOKI, H.S.; JAMOZA,J.E.;OLWENY,C.O.; RONO,J.K.. Characterization of physiologic races of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya.. **African Journal of microbiology research**. V. 4 p .1694-1697, 2010.

O-HECHAVARRÍA,M.L.,ZARDÓN-NAVARRO,M.A.;ARENCIBIA-RODRÍGUEZ, A. RODRÍGUEZ- LEMA, E., ACEVEDO-ROJAS, R.; MESA-LÓPEZ,J.M. Técnicas para el estudio de la interacción caña de azúcar- *Sporisorium scitamineum*. **Agronomía mesoamericana** v.22(1) p.157-165. 2011

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p.19-28. 2001.

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

PIEPENBRING, M.; STOLL, M.; OBERWINKLER, F. The generic position of *Ustilago maydis*, *Ustilago scitaminea* and *Ustilago esculenta* (Ustilaginales). **Mycological Progress**, München, v.1, p.71-80, 2002.

PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 52-58. 1999.

POZZA, A.A.A.; POZZA, E.A.; BOTELHO, D.M.S. O silício no controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. V.12, p. 373-403. 2004

QUE, Y.; XU, L.; LIN, J.; RUAN, M.; ZHANG, M. CHEN, R. Differential Protein Expression in Sugarcane during Sugarcane-Sporisorium scitamineum Interaction Revealed by 2-DE and MALDI-TOF-TOF/MS. **Comparative and Functional Genomics** .p10.2011

ROMERO, T. **Etanol global: Brasil será referência em estudo para uso mundial do etanol.** Online. Disponível em www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=etanol-global-brasilreferenciaestudo-uso-mundial-etanol. Acesso em 21 de setembro de 2011

SACILOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem Puccinia melanocephala.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", -Universidade de São Paulo, Piracicaba. p 74, 2003

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por Lentinula edodes e Agaricus blazei contra bactérias causadoras de murcha (Ralstonia solanacearum) e cancro (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis).** Tese de doutorado em Fitopatologia) Escola Superior De Agricultura Luiz De Queiroz. Piracicaba.p 98 2007.

SILVA, R.A.; REIS, V.M.;BALDANI, J.I., OLIVARES F.L. Defesa de planta contra ataque de fitopatógenos.Documento 250.**Seropédica: Embrapa Agrobiologia**. p 49.2008

STARGALIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA,K.R.F.; CRUZ, M.E.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, p. 16-21. 1999.

SUNDAR.A.R.;BARNABAS,E.L.; MALATHI.P.; VISWANATHAN,R. A Mini-Review on Smut Disease of Sugarcane Caused by Sporisorium scitamineum. **Plant Pathology section, Sugarcane Breeding Institute (ICAR)**.TamilNadu, Índia. 22p 2012.

SYDOW, H. Notizen uber Ustilagigeen. **Annual Mycology**, Lexington, v.22, p.277-291. 1927.

TIWARI, T.N.; PANDEY, V.B.; DUBEY, N.K. Plumieride from Allamanda cathartica as an antidermatophytic agent. **Phytother Research**, v. 16, p. 393-394, 2002

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al. (eds.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo, Edit Agronômica Ceres, v. 2, p. 185-196, 2005.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, v. 44, p. 1920-1934. 2004

VEIGA, F.M. Smut in Brazil. **Sugarcane Pathologists Newsletter**, Louisiana, v.9, p.17-25, 1972

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Induced systemic resistance by pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, p. 1-10. 2002.

YOU-XIONG,Q.; JIAN-WEI,L., XIAN-XIAN,S.; LI-PING, X.; RU-KAI,C. Differential Gene Expression in Sugarcane in Response to Challenge by Fungal Pathogen *Ustilago scitaminea* Revealed by cDNA-AFLP. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. Fujian .v..2011 p 10. 2011

ZANARDO, M.N . T. PASCHOLATI,S.F.,FIALHO M.B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae* **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.11, p.1499-1503, 2009

ZHANG HZ, CAI XZ. Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1): a key node of plant disease resistance signalling network. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**. v.21(4) p 511-515. 2005

CAPÍTULO 2

Manuscrito a ser colocado no idioma inglês e enviado ao periódico Genetic and Molecular
Research

Normas do periódico em: <https://www.geneticsmr.com/submission-guidelines>

Indução de resistência sistêmica em cana-de-açúcar com extrato de folha de *Allamanda blachetti* contra *Sporisorium scitamineum*.

Running head: Indução de resistência em cana-de-açúcar

L.M.S. Oliveira¹, C. M. A. Almeida², I.B.S. Santos², A. G. Silva³, L. S. Cavalcanti⁴, R. S.B. Coelho⁵, M. V. Silva^{1,2}, M.T.S Correia^{1,2}

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária. CEP 50670-901 Recife – PE, Brasil.

2 Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. 3 Núcleo de Bioprospecção e Conservação da Caatinga, Instituto Nacional do Semiárido/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – INSA/MCTI, Av. Francisco Lopes de Almeida, S/N, 58429-970, Campina Grande, PB, Brasil.

4 Instituto de Pesquisas em Substâncias Bioativas - IPESB, Universidade Federal do Vale de São Francisco (UNIVASF), Caixa Postal 510, 48902-300, Juazeiro – BA, Brasil.

5 Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA. Av. Gal. San Martin 1371,50761-000 Bonji, Recife – PE, Brasil.

Corresponding author: M.T.S. Correia

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife - PE Brasil

Tel.: +55 81 2126 8547

Fax: +55 81 2126 8576

E-mail: mtscorreia@gmail.com

RESUMO Esta pesquisa tem como objetivo analisar o efeito do extrato de *Allamanda blanchetti*, na indução de mecanismos de resistência em uma variedade de cana-de-açúcar susceptível à doença do carvão. Inicialmente, realizou-se uma análise fitoquímica por cromatografia em camada fina (TLC), para conhecer os principais compostos presentes. Detectou-se que o extrato etanólico de *A. blanchetii* apresentava Flavonóides, foram os compostos mais abundantes seguidos por terpenos, esteroides e saponinas. Em condições de casa de vegetação, as plantas de cana-de-açúcar, variedade SP-791011 (suceptível ao carvão), com 3 meses de idade, foram pulverizadas com extratos de *A. blanchetti* extraídos a frio a concentrações de 1000 ppm e ASM (100mg / L). As folhas foram coletadas às 0, 24 e 48 horas após a pulverização das plantas. Foram utilizadas amostras de tecidos de folha na análise RT-PCR para identificar a expressão do gene de defesa. A mudança na expressão gênica foi observada nos diferentes tratamentos, especialmente na expressão de genes relacionados à patogênese (PR): glucanase, peroxidase e quitinase. O extrato de *A. blanchetti* induziu um aumento na expressão da glucanase às 48 horas após a aplicação do tratamento e foi mais eficaz do que o indutor de ASM. O aumento da expressão do gene SNPR1 aumentou nos dois tratamentos. Os resultados indicam que os extratos de *A. blanchetti* foram capazes de ativar o mecanismo de resistência observado em plantas. Este artigo é o primeiro relato sobre o uso de extratos de plantas naturais de Caatinga induzindo genes de resistência contra *Sporisorium scitamine* em genótipo suscetível de cana-de-açúcar.

Palavras chave: *Saccharum sp.*, indução de resistência, doença do carvão, extrato de planta, PR- genes.

INTRODUÇÃO

O carvão é uma das doenças mais graves da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). A doença é causada por fungos, da espécie *Sporisorium scitamine*, que infecta as plantas através de brotos ou gemas de germinação no solo (Sundar et al., 2012), podem causar consideráveis perdas e reduções na qualidade da cana (Olweny et al., 2008).

O melhor método de controle é usar cultivares resistentes, que estão amplamente disponíveis em diferentes países onde a cana-de-açúcar é cultivada (Chen et al, 2012), no entanto, os custos tornam esta estratégia dispendiosa. A indução de resistência representa um grande potencial, como método alternativo de controle de patógenos das plantas. Neste método, o indutor não age diretamente no patógeno, mas estimula a planta a ativar seus

mecanismos de defesa em resposta à presença do patógeno. Estes mecanismos podem envolver enzimas como a β -1,3-glucanase, peroxidase e quitinase, dentre outras. Os extratos de plantas com substâncias bioativas podem apresentar a capacidade de atuar como indutores de resistência (Gomes, 2011)

O perfil fitoquímico é muito importante na identificação de novas fontes de compostos para uso terapêutico e industrial dentre as substâncias destacam-se os alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos, saponinas, esteróides, taninos e terpenoides. O conhecimento dos constituintes químicos das plantas é desejável porque essa informação será de valor para a síntese de substâncias químicas complexas. Os extratos vegetais que apresentam substâncias bioativas podem apresentar a capacidade de atuar como indutor de resistência. *Allamanda blanchetii* é uma planta ornamental da família Apocynaceae. É a planta nativa de Caatinga, uma região semi-árida do Nordeste do Brasil, Muitos fitoquímicos ativos foram isolados de suas folhas e raízes (Bhattacharyya; Morais 1986; Dionezine et al., 2006; Prabhadevia et al., 2012).

MATERIAL E METÓDO

MATERIAL VEGETAL

As folhas de *A. blanchetii* foram coletadas na cidade de Afrânio (Pernambuco, Brasil), na posição geográfica 8°47'88 "S e 40°93'79" W. O material da planta foi identificado um espécime foi depositado no Herbário IPA - Dárdano de Andrade-Lima, sob o código N° 84112. As folhas foram secas em estufa a uma temperatura de 40 ° C durante 72 h e depois moídas para obter um pó fino e uniforme. Cerca de 150g de folhas em pó secas da planta foram extraídas por maceração a frio com etanol absoluto durante 48h, sob agitação intermitente. O extrato foi então filtrado usando o papel de filtro e concentrado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e completamente seco sobre um banho de água regulado mantido a 50 ° C. Este extrato etanólico foi mantido a 4 ° C até os experimentos de análise fitoquímica serem realizados.

PERFIL FITOQUÍMICO

O rastreio fitoquímico do extrato de *A. blanchetti* foi realizado por Cromatografia em camada fina (TLC), de acordo com Harborne (1998), em placas de sílica (60F254, de alumínio, espessura de camada de 200 μ m, 8.0 x 5.0 cm, Merck, Darmstadt, Alemanha). A

presença de metabólitos secundários foi investigada utilizando os cinco sistemas de desenvolvimento adequados. Após o desenvolvimento, as placas foram secas ao ar e pulverizadas com os reveladores.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos com a cana-de-açúcar-açúcar, foram realizados em uma estufa localizada no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e os ensaios no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil. Foi utilizada a variedade de cana-de-açúcar- SP-791011 (suscetível ao carvão), a qual foi fornecida pela empresa Agro-Indústrias do Vale do São Francisco S.A. - AGROVALE.

As plantas de cana-de-açúcar, variedade SP-791011, foram plantadas e cultivadas em potes de PVC contendo 15 kg de solo por 95 dias. O experimento foi realizado em estufa (29°C e 70% UR) com 28 amostras em blocos ao acaso e sete repetições. Nos 90 dias após a germinação, iniciou-se aplicando os seguintes tratamentos: (1) pulverização com água destilada estéril (concentração 0); (2) pulverização com extrato bruto de *A. blanchetti*, extração a frio, a uma concentração de 1000 ppm; (3) ASM (acilbenzolar-S-metil), a uma concentração de 100 mg l⁻¹.

ASM é um dos elicitores mais utilizados no controle de doenças de plantas através da indução de resistência e foi utilizado neste experimento com o objetivo de comparar os resultados da expressão gênica de *A. blanchetti*.

EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR

As folhas de cana-de-açúcar foram coletadas às 0h, 24h e 48 horas após a indução. As amostras foram mantidas a -80 ° C até serem processadas. O RNA total foi isolado a partir de folhas usando TRIzol® Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA total foram medidas por eletroforese em 1,2% de gel de desnaturante de agarose e espectrofotômetro. Alíquota de 5 mg de RNA total foi utilizada como modelo na análise RT-PCR usando o kit SuperScript® III (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA complementar (cDNA) obtido às 0h, 24h e 48h de tratamento foi utilizado para amplificação por PCR de genes PR. A RT-PCR foi realizada nas seguintes condições: 50 ° C durante 30 min e 94 ° C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de amplificação (94 ° C durante 30 segundos, 55 ° C durante 30 segundos e 72 ° C durante 1 min) e 7 min a 72 ° C. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes PR estão

listados na Tabela 1. O produto de amplificação final foi separado num gel de agarose a 1,2%, visualizado e analisado pelo software L-PIX EX (Loccus).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação fitoquímica de extratos orgânicos brutos de folhas de *A. blanchetti* revelou a presença de vários metabolitos secundários. Os flavonóides foram compostos mais abundantes seguidos por terpenos, esteróides e saponinas (Tabela 2). Estes resultados mostraram que o extrato vegetal possui moléculas com potencial bioativo. Outros metabolitos como alcalóides, cumarinas, quinonas e açúcares redutores estavam ausentes nos extratos. Para investigar se os genes relacionados à defesa são induzidos por extrato bruto de *A. blanchetti*, os RNAs totais de folhas de cana foram extraídos e analisados por RT-PCR. A análise da expressão gênica mostrou que, os indutores foram eficientes na ativação de uma via metabólica de defesa (Tabela 3). Os indutores ASM e extrato de *A. blanchetti*, utilizados neste estudo, foram ambos efetivos na indução de genes de resistência, no entanto, eles mostraram diferenças na expressão da Glucanase 48 h após a indução. A expressão deste gene foi significativamente maior no tratamento com extratos vegetal em relação ao indutor de ASM. Os genes da peroxidase e da quitinase foram 2 vezes mais expressos às 48 horas após a inoculação. O mesmo resultado foi observado no tratamento com o indutor de ASM. O gene PR-5 foi 2 vezes mais expresso apenas às 24 h com extratos de *A. blanchetti*. O gene SCNPR1, ativador da via de defesa metabólica, teve expressão aumentada ao longo do tempo (3 vezes) em ambos os tratamentos, não variando de controle.

Para investigar as respostas da cana-de-açúcar nos estágios iniciais, após a aplicação com elicitores, realizamos estudos fitoquímicos e avaliaram o perfil de expressão gênica da espécie de genótipos de cana-de-açúcar suscetível a fumaça. As plantas medicinais contêm metabolitos secundários, que muitas vezes desempenham um papel importante nas defesas das plantas e são capazes de destruir ou inibir o crescimento do microorganismo (Savithamma et al., 2011). As propriedades antipatógenas dos flavonóides resultam das suas fortes propriedades antioxidantes. A sua atividade antifúngica baseia-se na inibição do desenvolvimento de esporos e alongamento das hifas do micélio (Blount et al., 1992). O papel das saponinas nas plantas para proteger contra fungos fitopatogênicos (Koul, 2008). O extrato de espécies de *Allamanda* foi comprovado como efetivo no controle de fungos patogênicos de plantas (Islam 2004; Basar et al., 2011). No entanto, são poucos os relatos

detalhados de extrato de folhas e sua atividade antifúngica contra patógenos das plantas. No entanto, é relatado que *A. blanchetii* tem diferentes bio-atividades e, é importante pesquisas adicionais para isolar os princípios ativos e correlacionar com suas atividades biológicas.

As plantas ao iniciar sua defesa ativa duas rotas principais na indução de resistência sistêmica: SAR (resistência sistêmica adquirida) e ISR (resistência induzida sistêmica), que promovem a expressão de proteínas PR. O éster-S-metilo do ácido benzo- (1,2,3) -triazole-7-carbotioico é um dos indutores de resistência mais promissores e mais utilizados, que proporciona proteção a um amplo espectro de agentes patogênicos. Fornecer maior resistência a doenças em muitas espécies de plantas, por sua ação semelhante ao ácido salicílico na via de transdução de sinal (Halim et al., 2007). Estudos mostraram que a ASM induz a atividade de 1,3- β -glucanase, peroxidase e quitinase, confirmando o envolvimento dessas enzimas na resistência sistêmica adquirida. As β -1, 3-glucanases de planta são proteínas relacionadas com a patogênese (PR), que pertencem à famílias proteínas PR-2, as quais estão relacionadas à patogênese e acredita-se que desempenham um papel importante nas respostas de defesa da planta à infecção por patógenos (Ebrahim et al. , 2011).

O gene 1 (PR1) relacionado à patogênese é particularmente induzido durante a resposta à defesa, sendo usado como marcador para o estabelecimento de SAR nas plantas. A proteína NPR1 (não-expressor do gene 1 relacionado à patogênese) é um co-ativador transcricional e regulador positivo da SAR, um sinal de defesa móvel duradouro encontrado nas plantas. O gene NPR1 foi clonado e caracterizado em Sugarcane (*Saccharum spp. Hybrids*) (ScNPR1). Demonstrou-se que compartilha uma identidade de seqüência de 83% com NPR1 de milho (ZmNPR1), além de exibir uma relação muito próxima com NPR1 de banana (MdNPR1) (Chen et al. 2012). Características típicas dos genes NPR1 são altamente conservadas em muitas espécies (Cao et al., 1997; Chern et al., 2005; Endah et al., 2008). Chen et al. (2012) observaram que plantas de cana-de-açúcar resistentes em contato com o patógeno ativam esse gene para prevenir a infecção por *S. scitamineum*.

LaO et al. (2008) examinaram as proteínas de expressão diferencial em variedades resistentes e resistentes à cana-de-açúcar após a inoculação com *S. scitamineum* às 0, 24 e 72 horas após a inoculação. Nas de genótipo susceptível a proteína PR-5 e a peroxidase foi regulada, apenas com 24 h, enquanto que as plantas resistentes foram reguladas em 24 e 72 h após a inoculação. Glucanase e quitinase foram regulados apenas genótipos resistentes às 24 h e 72 h. Em nosso estudo, com um genótipo suscetível, a glucanase e a quitinase foram expressas em diferentes níveis a 0, 24 e 48 h. Isso demonstra que o uso de extracto de *A.*

blanchetti como elicitor foi capaz de induzir genes de defesa em plantas em resposta à doença do carvão de cana-de-açúcar.

Extratos de *Allamanda blanchetti* e ASM apresentaram respostas semelhantes em relação à indução da expressão de genes de resistência. Assim, entende-se que a expressão de proteínas PR, deve-se aos produtos do metabolismo secundário da *A. blanchetti*, como compostos fenólicos e seus derivados, ou seja, a aplicação de produtos naturais pode contribuir para a redução de doenças em da cana-de-açúcar.

CONCLUSÃO

O extrato natural de uma planta de Caatinga foi capaz de ativar os mecanismos de resistência. O extrato alcoólico de *Allamanda blanchetti* possui substâncias antimicrobianas que podem inibir o crescimento dos fungos patogênicos. O extrato desta planta foi capaz de atuar na ativação de mecanismos de defesa em um genótipo suscetível ao carvão da cana-de-açúcar, aumentando a expressão dos genes PRs e ScNPR1. Além disso, apresentou níveis de expressão semelhantes ao indutor de resistência ASM, demonstra que o extrato pode ser utilizado como potencial elicitor de resistência para o controle alternativo de infecção por *S. scitamine* em plantas de cana-de-açúcar.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado em parceria com o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e a Universidade Federal de Pernambuco, recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem as Agro-Indústrias do Vale do São Francisco S.A. – AGROVALE, pela colaboração.

REFERÊNCIAS

Basar MK, Alam MJ, Ferdous R, Khokon MAR, et al. (2011). *Allamanda* tablet for controlling phomopsis blight and fruit rot of eggplant. *International Journal of Agricultural Sustainability* 7:23–29.

Bhattacharyya J; Morais M.S.Q, (1986). 5,6-dimethoxy-7-hydroxycoumarin (unckalin) from *Allamanda blanchettii*, isolation and ¹³C-NMR characteristics. *J Nat Prod*, 49:354

- Blount, JW; Dixon, RA; Paiva, NL.(1992) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41:333–349.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, et al. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57-83.
- Chen JW, Kuang JF, Peng G, et al. (2012). Molecular cloning and expression analysis of a npr1 gene from sugarcane Pakistan *Journal of Botany.* 44(1):193-200.
- Chern MS, Fitzgerald HA, Canlas PE, et al. (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 18: 511-520.
- Dionezine F, Navarro S., Rosendo AY et al.(2006) Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of *Allamanda blanchetii* and *A. schottii* on the growth of leukemic and endothelial cells. *J Pharm Pharm Sci*,9 (2):200-208.
- Ebrahim S, Usha K, Singh B (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Science Against Microbial Pathogens.* 2:1043–1054.
- Endah R, Beyene G, Kiggundu A, (2008). Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. *Plant Physiol. Biochem.*, 46:1007-1014.
- Gomes, E.C.S. (2011) Extrato de *Allamanda blanchetti* na indução de fitoalexinas em sorgo e resistência em videira ‘Superior Seedless’ contra *Uncinula necator*. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia.
- Halim VA, Eschen-Lippold L, Altmann S,(2007) Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 20:1346-1352.
- Harborne JB, (1998). *Phytochemical Methods*. 3rd Edition, Chapman & Hall, Londres.
- Islam R, (2004). Chromatographic separation of components in garlic bulb and *Allamanda* leaf extracts inhibitory to *Phomopsis vexans*. Ph.D. Thesis. Mymensingh, Bangladesh Agricultural University
- Koul O, (2008). *Phytochemicals and Insect Control: An Antifeedant Approach*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27(1): 1-24.
- LaO M, Arencibia A, Carmona E, et al. (2008). Differential expression analysis by cDNA-AFLP of *Saccharum* spp. after inoculation with the host pathogen *Sporisorium scitamineum*. *Plant Cell Reports* 27: 1103-1111.
- Olweny C, Kahi N, Nzioki H, Githiri SM.(2008). Evaluation of smut inoculation techniques in sugarcane seedlings. *Sugar Tech.*, 10: 341-345.

Prabhadevi V, Sahaya SS, Johnson M, Venkatramani B, Janakiraman N (2012). Phytochemical studies on *Allamanda cathartica* using GC– MS. *Asian Pacific J. Trop. Biom.* 2(2):550-554.

Savithramma N, Linga RM, Suhrulatha D, (2011). Qualitative and quantification analysis of phytochemicals from leaf aqueous extract of *Allamanda cathartica* L. and *Terminalia paniculata* Roth. *Journal of Pharmacy Research* 6 (8): 821-825.

Sundar AR, Ashwin NMR, Barnabas EL, Malathi P, et al. (2012). Disease resistance in sugarcane-an overview. *Scientia Agraria Paranaensis* 4: 200.

TABELAS

Tabela 1- Sequencia de primers utilizadas para amplificação dos genes PR e suas temperaturas de anelamento (TA) respectivamente.

Primer	Sequência 5'-3'	TA°C
Quitinase S	AGAAGATGAAGCGGAAGACG	59
Quitinase A	CCCCTTGGTGTAGGTCCTTT	60
Glucanase S	CGAGTGAAAAGCAGGGACAG	60
Glucanase A	ATGTCCGAGTTGCCGTTCT	59
PR5 S	AAACAAGGCAGAGCACCAAC	60
PR5 A	GGGCAGAAGGTGACTTGGTA	60
Peroxidase S	AAAGGGTCCTAGCGTCCAAT	59
Peroxidase A	ACATTGACGAAGCAGTCGTG	59
SNPR1f	TGTCTTCATCGTCGTCGTGCGT	59
SNPR1r	TCCCAGGTCTCCAAAACCGTGAT	61

Tabela 2 - Perfil fitoquímico do extrato orgânico das folhas de *Allamanda blanchetti*

Metabolitos secundários	Padrão	Sistema	Leitura
Flavonoides	Quercitina, rutina	A	+++
Fenilpropanoides	Ácido clorogênico	A	
Triterpenos	β -sitosterol	B	++
Esteróides	β -sitosterol	B	++
Saponinas	-	A	++
Monoterpeno e	Tymol	C	++
Sesquiterpenos			
Cumarinas	Cumarina	D	-
Quinona	Lapachol	D	-
Alcaloide	Pilocarpina	A	-
Proantocianidinas	Catequina	A	-
eleucoantocianidinas			
Taninos	Acido gálico	E	+
Açúcar Reduzido	Glucose	F	-

A, AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:27 v/v); B, Tolueno:AcOEt (90:10 v/v); C, Tolueno:AcOEt (97:3 v/v); D, CHCl₃-MeOH (98:2 v/v); E, n-BuOH-H₂O-AcOH (40:50:10 v/v); F, n-BuOH-Me₂CO-TF (pH = 5,0) (40:50:10 v/v) + trace; ++ present; - absent; +++ abundant; (1)3',4'-OH flavonoids (aglycones, mono-, di- and tri-glycosides)

Tabela 3: Expressão de genes PR em cana-de-açúcar (susceptível ao carvão) variedade SP- 791011 em resposta da indução com ASM (acilbenzolar-S-metil) e extrato de *A. blanchetti* coletado as 0, 24, and 48 horas depois da inoculação.

Tabela 3 - Expressão de pr genes da cana-de-açúcar (suscetível à doença do carvão) em resposta à indução com extrato de ASM (acilbenzolar-S-metil) e *A. blanchetti* em 24 e 48 horas após a indução.

Genes PR	Tratamento					
	ASM			<i>Allamanda blanchetti</i>		
	0h	24hs	48hs	0h	24hs	48hs
Glucanase	+	++	++	+	++	+++
Peroxidase	+	++	++	-	+	++
Quitinase	+	++	++	+	++	++
PR5	-	-	+	-	++	+
ScNPR1	+	++	+++	+	++	+++

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do perfil fitoquímico de *Allamanda blanchetii* apresentou compostos . como flavonoides, terpenos, esteróides e saponinas. Verificou-se que tanto o extrato etanólico de *Allamanda blanchetii* quanto o Acilbenzolar-S-metil (ASM), induziram resistência em cana-de-açúcar, aumentando a expressão de genes PR. O extrato de *A. blanchetii* é um importante promissor para indução de resistência, devendo seu perfil fitoquímico ser mais explorado em futuras pesquisas.