

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Kelly Simões

**CARACTERIZAÇÃO DO ELICIADOR DO FUNGO *Mucor*
ramosissimus E ESTUDO DA SUPRESSÃO DE SUA ATIVIDADE
INDUTORA EM SOJA POR FRAGMENTOS DE POLISSACARÍDEOS
PÉCTICOS**

**Tese apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural
na área de: Biologia Celular.**

Orientadora: Dra. Márcia Regina Braga

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Simões, Kelly

Si51c

Caracterização do eliciador do fungo *Mucor ramosissimus* e estudo da supressão de sua atividade indutora em soja por fragmentos de polissacarídeos pécticos / Kelly Simões. --

Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Márcia Regina Braga

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Fitoalexinas. I. Braga, Marcia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 09 de agosto de 2004.

Banca examinadora

Profa. Dra. Márcia Regina Braga (Orientadora) _____
(Assinatura)

Profa. Dra. Maria Cláudia Marx Young _____
(Assinatura)

Profa. Dra. Rosemeire Aparecida Bom Pessoni _____
(Assinatura)

Profa. Dra Ione Salgado _____
(Assinatura)

*Aos meus pais, Valnê e José,
com carinho, dedico.*

AGRADECIMENTOS

- À Deus por manter minha força e saúde para realização deste trabalho.
- À Dra. Marcia Regina Braga pela dedicada orientação, oportunidade e paciência.
- Ao Dr. Michael G. Hahn (University of Georgia –USA) pela colaboração com o trabalho.
- Aos professores Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, Dra. Shirlei Recco Pimentel e Dr. Odair Aguiar Júnior pela avaliação da minha aula de qualificação.
- Aos amigos Claudia Alves da Silva, Clóvis Oliveira Silva, Marília Gaspar Mais, Marco Aurélio Tiné e Lourdes Isabel pelo apoio dado no laboratório, dicas, sugestões e pelos momentos de descontração.
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.
- À Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo pela utilização do laboratório.
- À Seção de Sementes do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) por fornecer as sementes de soja.
- À minha irmã Silvania Simões pelo incentivo e pela ajuda nos momentos difíceis.
- À minha sobrinha Gabi e à afilhada Kamila pelas alegrias proporcionadas.
- À Alice Martimiano pelo oferecimento de paz e sossego do seu lar.
- À Patrícia Pinho, Amanda Asega, Giovanna, Patrícia Gaya, Maria Tereza, Fabiana, Liliana, Marisa Oliveira, Josimara, Vanessa, Tatiana, Grazielle e a todos os amigos, funcionários e pesquisadores da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	i
<i>1.1 Respostas de defesa em plantas contra fungos</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Elicidores: reconhecimento e transdução de sinais</i>	<i>3</i>
<i>1.3 Elicidores fúngicos</i>	<i>7</i>
<i>1.4 Elicidores derivados de plantas</i>	<i>12</i>
<i>1.5 Moléculas supressoras</i>	<i>14</i>
<i>1.6 Estudos da indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (Glycine max)</i>	<i>16</i>
<i>1.7 O fungo Mucor ramosissimus</i>	<i>17</i>
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
<i>3.1 Cultura do fungo</i>	<i>22</i>
<i>3.2 Obtenção do eliciador a partir de esporos</i>	<i>22</i>
<i>3.3 Purificação parcial do eliciador por precipitação etanólica</i>	<i>23</i>
<i>3.4 Determinação de parâmetros de crescimento, esporulação e atividade indutora de M. ramosissimus cultivado em SMA</i>	<i>23</i>
<i>3.5 Curva Dose-resposta</i>	<i>24</i>
<i>3.6 Bioensaio de atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja</i>	<i>25</i>
<i>3.7 Extração de gliceolinas dos difusatos de soja e detecção por HPLC</i>	<i>26</i>
<i>3.8 Purificação e caracterização do eliciador de M. ramosissimus</i>	<i>26</i>

3.8.1 Cromatografia de troca iônica – Hi Trap Q Sepharose	28
3.8.2 Cromatografia de afinidade – Sepharose Concanavalina A	28
3.8.3 Cromatografia de exclusão molecular – Bio Gel P-2	29
3.9 Tratamento do eliciador de <i>M. ramosissimus</i> com protease e periodato de sódio	29
3.10 Análise de composição do eliciador por HPAEC/PAD e GC/MS	30
3.11 Análise de ligação glicosídica.....	31
3.12 Obtenção de oligogalacturonídeos	32
3.13 Isolamento de oligogalacturonídeos	33
3.14 Ensaios de supressão da atividade indutora de <i>M. ramosissimus</i> por oligogalacturonídeos.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Determinação de parâmetros de crescimento, esporulação e atividade indutora para <i>M. ramosissimus</i> crescido em SMA	34
4.2 Purificação e caracterização do eliciador de <i>M. ramosissimus</i>	43
4.3 Obtenção de oligogalacturonídeos e ensaios de supressão da atividade indutora do eliciador de <i>M. ramosissimus</i> em cotilédones de soja	68
4.3.1 Obtenção de oligogalacturonídeos	68
4.3.2 Ensaios de supressão da atividade indutora do eliciador de <i>M. ramosissimus</i>	73
5 CONCLUSÕES	78
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

Mucor ramosissimus Samutsevitch, um fungo sapróbio isolado do filoplano de rubiáceas nativas tropicais, contém em seus esporos um potente eliciador capaz de induzir a síntese de fitoalexinas em espécies de rubiáceas e em cotilédones de soja. Estudos prévios indicaram que a atividade eliciadora dessa molécula pode ser inibida por ação de fragmentos pécticos (oligogalacturonídeos) derivados de parede celular de plantas. Este trabalho teve por objetivos purificar e caracterizar parcialmente este eliciador, e analisar a possível supressão de sua atividade indutora da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja por ação de oligogalacturonídeos. Parâmetros de crescimento, esporulação e atividade indutora determinadas para o fungo crescido em meio de cultura mínimo demonstraram que o 9º dia de cultivo é o melhor para obtenção de moléculas eliciadoras ativas na indução de gliceolinas. A purificação do eliciador por precipitação etanólica, cromatografias de troca iônica e de afinidade resultou em aumento de sua atividade específica e indicou a presença de ligações do tipo β em sua estrutura química. O tratamento do eliciador de *M. ramosissimus* com periodato de sódio aboliu sua capacidade indutora de fitoalexinas em soja, indicando que esta atividade é determinada pela porção glicídica de sua molécula. Análises da composição de açúcares realizadas por HPLC e por GC/MS revelaram a presença de ácido glucurônico e manose em maiores proporções, seguidos de glucose, galactose e traços de fucose. Análises de ligação glicosídica revelaram a ausência de unidades de glucose 3 e 3,6 ligadas, indicando que este eliciador difere estruturalmente do β -glucano isolado de micélios do fungo *Phytophthora sojae*. Ensaio de competição, nos quais o eliciador de *M. ramosissimus* foi co-aplicado com oligogalacturonídeos, revelaram que estes fragmentos parecem inibir diferencialmente as rotas biossintéticas dos metabólitos induzidos em

soja pelo eliciador do fungo sapróbio *M. ramosissimus* quando comparado ao β -glucano obtido do patógeno *P. sojae*. Os dados obtidos indicam que as plantas possuem a capacidade de responder a presença de fungos através do reconhecimento de moléculas eliciadoras com estruturas e atividades distintas e que são derivadas tanto de fungos patogênicos como de sapróbios. A atividade dessas moléculas eliciadoras pode ser alterada pela presença de oligogalacturonídeos.

ABSTRACT

Mucor ramosissimus Samutsevitsch is a saprophytic fungus isolated from the leaf surface of tropical Rubiaceae and that contains in its spores a potent elicitor of phytoalexin production in Rubiaceae species and soybean cotyledons. Previous results indicated that the eliciting activity of this elicitor could be suppressed by pectic fragments from plant cell walls (oligogalacturonides). The aims of this work were to purify and partially characterize the elicitor derived from spores of *M. ramosissimus* and analyze the suppression of its activity by oligogalacturonides. The 9th day of culture was the best to obtain the elicitor from autoclaved spores, considering growth parameters, sporulation, and inducing activity. The elicitor purification performed by ethanol precipitation and anion exchange and affinity chromatography, resulted in considerable increase in its specific activity, and indicated the presence of β -linked sugar residues. The eliciting activity was abolished after treatment with sodium periodate, indicating that the sugar moiety is important for its activity. Sugar composition, analyzed by HPLC and GC/MS, revealed the predominance of glucuronic acid and mannose, followed by glucose, galactose and traces of fucose. Glycosyl-linkage analyses of the elicitor revealed the absence of 3 e 3,6-linked glucosyl residues indicating that the *M. ramosissimus* elicitor presents distinct structure and composition when compared to the β -heptagluco-side obtained from *Phytophthora sojae*. The application of *M. ramosissimus* elicitor together with oligogalacturonides on soybean cotyledons resulted in inhibition of the biosynthetic pathways leading to the synthesis of secondary metabolites, this inhibition being different from that observed when the β -glucan from *P. sojae* was used. Our results indicate that plants are able to respond to the presence of fungi by recognizing eliciting molecules with distinct structure and activity derived from pathogenic as well as from saprophytic species. The activity of these

eliciting molecules can be altered by the presence of cell wall fragments derived of plant cell walls.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Respostas de defesa em plantas contra fungos

Assim como os animais, as plantas estão continuamente expostas a diversos organismos potencialmente patogênicos como vírus, bactérias, protozoários, fungos e nematódeos. Ao longo da evolução, plantas e microrganismos desenvolveram uma intrincada relação, resultando em uma troca de informação molecular contínua. Os patógenos dispõem de várias estratégias ofensivas para parasitar as plantas e estas, em contrapartida, possuem um amplo arsenal de mecanismos de defesa (Benhamou, 1996).

Dentre os microrganismos patogênicos, os fungos são os responsáveis por mais de 80 % das doenças vegetais já descritas. A maioria desses organismos carbono-heterotróficos vive uma relação benéfica com as plantas; outros são sapróbios e degradam matéria vegetal morta, reciclando nutrientes e tornando-os disponíveis para as plantas vivas. Apenas poucas espécies de fungos se especializaram e quebraram as interações mutualísticas, tornando-se patógenos de plantas (Grayer & Kokubun, 2001). A evolução dos fungos em direção a patogenicidade pode ser vista como uma seqüência de eventos, que incluiu primeiramente a necessidade dos fungos de adquirir atributos que lhes possibilitassem viver em diferentes espécies vegetais, para que depois ocorresse o refinamento destas características e o desenvolvimento de estratégias que aumentassem sua virulência (capacidade de causar doenças) em espécies definidas, atingindo desta forma a posição de um patógeno específico (Knogge, 1996).

As estratégias desenvolvidas pelos fungos para invadir tecidos vegetais, otimizar seu crescimento e se propagar incluem mecanismos para transpor as barreiras estruturais (como a cutícula e parede celular de células da epiderme); a secreção de toxinas ou de outros compostos

que modifiquem a fisiologia do vegetal em seu benefício e a liberação de moléculas que interferem no processo de reconhecimento dos mesmos ou que suprimem a resposta de defesa das plantas (Knogge, 1996).

A resistência a doenças pode ser definida como a habilidade da planta em prevenir ou restringir o crescimento do patógeno e sua multiplicação em seus tecidos. Dois tipos de resistência, designadas de acordo com a especificidade das interações, controlam as infecções por fungos: a resistência inespecífica, na qual a planta é considerada não-hospedeira e que confere proteção a uma grande diversidade de fungos, e a resistência raça-específica, a qual atua somente contra raças específicas de patógenos. Esta última, denominada de resistência gene-a-gene, é condicionada à interação de um par de genes, ou seja, sua ativação depende do reconhecimento por parte da planta (que contém um gene dominante de resistência R) e de um patógeno que possui um gene dominante de avirulência (Avr) (Jackson & Taylor, 1996; Knogge, 1996; Mysore & Ryu, 2004).

Os mecanismos de defesa vegetal podem ser constitutivos (pré-existent), presentes antes da infecção, ou induzidos, quando resultantes da interação hospedeiro-parasita. Neste último tipo enquadram-se repostas de defesa como a reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela morte rápida e localizada de células junto ao sítio de infecção; a produção de proteínas relacionadas a patogênese (PR), que possuem propriedades antimicrobianas; alterações estruturais na parede celular vegetal, como a deposição de lignina e proteínas ricas em hidroxiprolina; o desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual confere resistência às infecções subseqüentes; e a principal resposta de defesa induzida, a síntese *de novo* de metabólitos secundários antimicrobianos, denominados fitoalexinas (Dixon *et al.*, 1994; Côté *et al.*, 1995; Harborne, 1999).

A resistência induzida é baseada na interação de moléculas presentes nas superfícies da planta e do patógeno em potencial. Dessa forma, ela inclui eventos como a percepção de um sinal pelo hospedeiro, a transdução intracelular deste sinal de reconhecimento e a ocorrência de mudanças físicas e bioquímicas que inibem o desenvolvimento do patógeno (Dixon *et al.*, 1994). Estas moléculas, liberadas durante o estágio inicial de interação planta-microrganismo e capazes de ocasionar mudanças na cascata de sinalização intracelular que leva a ativação da transcrição de genes de defesa, são denominadas eliciadores (Tarchevsky, 2000; Sudha & Ravishankar, 2002).

1.2 Eliciadores: reconhecimento e transdução de sinais

O termo eliciador foi inicialmente utilizado para denominar apenas as moléculas capazes de induzir a produção de fitoalexinas em plantas. Mas, recentemente, este termo tem sido aplicado a todos os compostos que induzem qualquer tipo de resposta de defesa nos vegetais (Ebel & Cosio, 1994; Hahn, 1996; Nürnberger, 1999). Os eliciadores podem ser considerados como bióticos, quando derivam dos tecidos do patógeno ou do hospedeiro, ou abióticos, quando incluem substâncias como fungicidas e sais de metais pesados ou tratamentos que causam estresse nos tecidos vegetais, como congelamento e exposição à luz ultravioleta (Smith, 1996).

Os eliciadores derivados de patógenos ainda podem ser classificados como eliciadores gerais (inespecíficos), os quais desencadeiam a defesa em plantas hospedeiras e não hospedeiras; ou raça-específicos, capazes de induzir respostas apenas em cultivares específicos de hospedeiros. Dessa forma, um eliciador específico pode ser codificado por genes Avr presentes em patógenos, que vão elicitar a resistência em variedades de plantas que contêm o gene R correspondente (Montesano *et al.*, 2003).

Durante a interação planta-patógeno, moléculas eliciadoras podem ser liberadas da parede celular de fungos através da autólise que ocorre durante o processo normal de germinação dos esporos e crescimento das hifas. A ação de enzimas derivadas das plantas, como quitinases e β -glucanases, que despolimerizam polissacarídeos presentes na parede celular do fungo (no caso, quitina e glucanos, respectivamente) e causam a ruptura de células do patógeno, inibindo o crescimento do mesmo, também podem gerar moléculas eliciadoras. Adicionalmente, os fungos para facilitar a penetração de suas hifas nos tecidos vegetais, também secretam enzimas que digerem os polímeros da parede celular do hospedeiro, liberando oligossacarídeos sinalizadores de respostas de defesa, denominados eliciadores endógenos. Dessa forma, a parede celular vegetal, além de representar uma barreira física de defesa ao ataque de microrganismos, participa ativamente na interação molecular entre plantas e patógenos (Braga *et al.* 1993; Esquerré-Tugayé *et al.*, 2000, Vorwerk *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm mostrado que o reconhecimento de eliciadores pelas plantas está relacionado à presença de proteínas na membrana plasmática das células vegetais, que agem como receptores. A existência destes sítios específicos de ligação de natureza protéica tem sido extensivamente demonstrada para oligossacarídeos, glicopeptídeos e peptídeos (Cheong & Hahn, 1991; Baureithel *et al.*, 1994; Hahn, 1996).

A ligação dos eliciadores aos receptores de membrana dispara vários eventos que amplificam as vias de sinais intracelulares e levam a ativação de fatores de transcrição dos genes de defesa da célula vegetal. Esse processo ocorre principalmente pela geração e interação de mensageiros secundários e moduladores da regulação de mecanismos de defesa, conforme mostrado no esquema da Figura 1 (Benhamou, 1996; Tarchevsky, 2000; Nürnberger & Scheel, 2001).

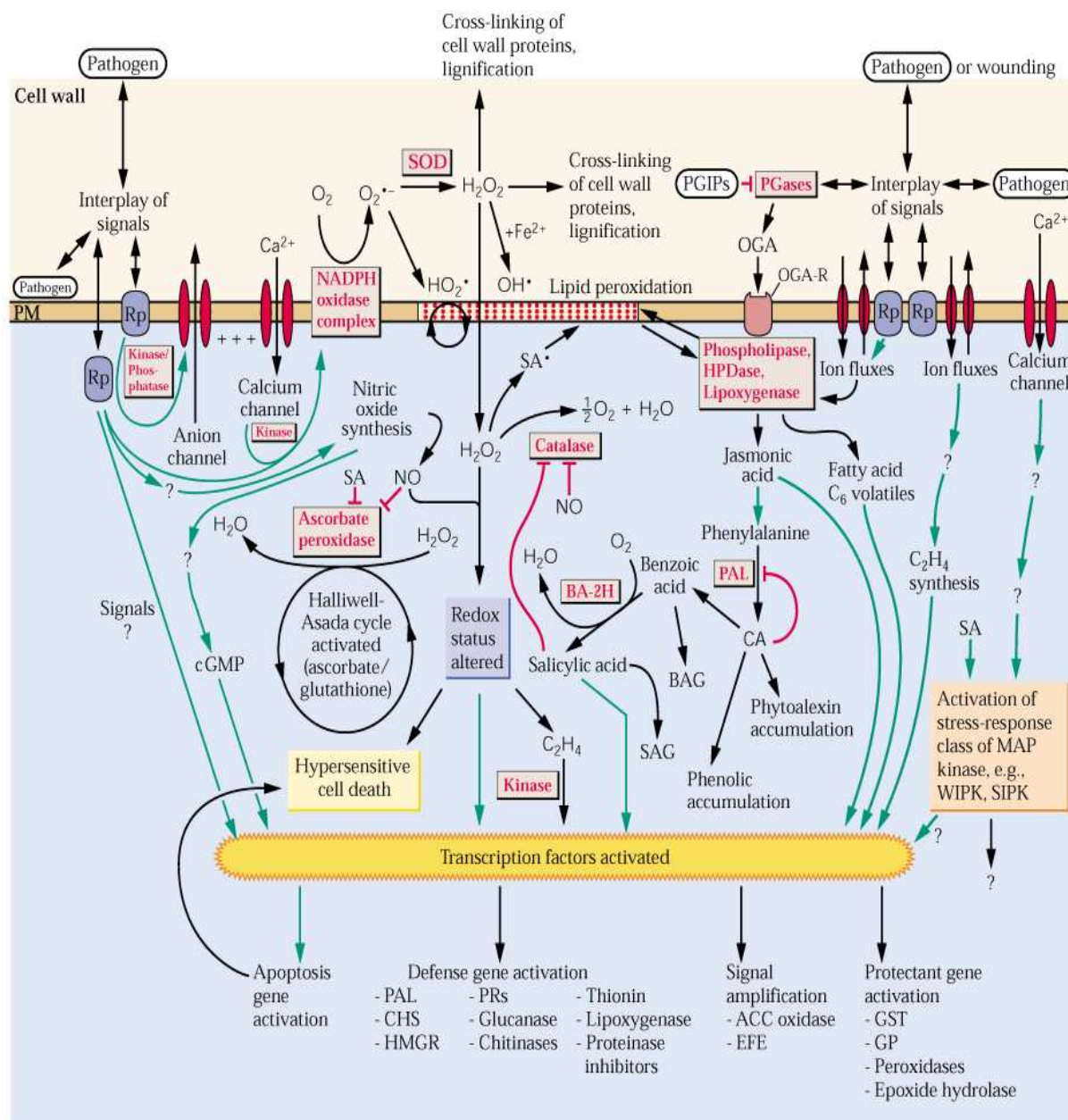


Figura 1. Transdução de sinais durante a resposta de defesa vegetal. Rp, receptores; BA, ácido benzóico; AS, ácido salicílico; JA, ácido jasmônico, SOD, superóxido dismutase; ACC oxidase, aminociclopropano – 1-ácido carboxílico oxidase; BAG, glucosídeo de ácido benzóico; BA-2H – ácido benzóico hidroxilase; CA, ácido cinâmico; cGMP, guanosina monofosfato cíclica; CHS, chalcona sintase; EFE, enzima formadora de etileno; GP, glutatona peroxidase; GST, glutatona S-transferase; HMGR, 3'-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase; HO₂[•], radical hidroperoxila; MAP, proteínas ativadoras de mitose; NO, óxido nítrico, OH[•], radical hidroxila, OGA e OGA-R, oligogalacturonídeos e receptores; PAL, fenilalanina amônia liase; PGases, poligalacturonases; PM, membrana plasmática; SA[•], radical de ácido salicílico; SAG, glucosídeo de ácido salicílico; SIPK, proteína quinase induzida por ácido salicílico; e WIPK, proteína quinase induzida por injúria (retirado de Hammond-Kosack & Jones, 2000).

Um dos eventos primários que ocorre após o reconhecimento, além da desorganização do citoesqueleto, é a produção de intermediários reativos de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode estar diretamente relacionada à atividade antimicrobiana ou estar associada a peroxidação de lipídeos e a ligação cruzada de proteínas ricas em hidroxiprolina e a lignificação da parede celular (Apostol *et al.*, 1989; Benhamou, 1996; Cervone *et al.*, 1997). Diversos trabalhos têm mostrado que as ROS agem como mensageiros secundários nas vias de transdução de sinais mediadas por eliciadores, conforme indicam as observações de que a adição de catalase em culturas de células ou hipocótilos de soja bloqueia a indução da síntese de fitoalexinas promovida por eliciadores, o que sugere o envolvimento de H_2O_2 neste processo (Dixon *et al.*, 1994, Gómez *et al.* 1994).

Além da geração de ROS, rápida alteração na permeabilidade da membrana plasmática ao Ca^{2+} , K^+ e Cl^- tem sido observada após o tratamento com eliciadores. O fluxo de Ca^{2+} é considerado como um evento chave nas vias de sinalização de eliciadores. O aumento de Ca^{2+} intracelular é de extrema importância para processos como o reforço da parede celular; a ativação de proteínas por fosforilação e por AMP cíclico e a formação de complexo cálcio-calmodulina associado ao citoesqueleto (Stäb & Ebel, 1987; Benhamou, 1996). O óxido nítrico (NO) também tem sido relatado como um mensageiro secundário na ativação de genes de defesa em plantas (Nürnberger & Scheel, 2001; Modolo *et al.*, 2002).

Outros compostos têm mostrado envolvimento na via de transdução de sinais intracelulares para o núcleo, são eles: o etileno; o ácido jasmônico (JA), que é um derivado bioativo de ácidos graxos, originado a partir do ácido linoléico pela ação de lipooxigenases; e o ácido salicílico (SA), um produto da via de fenilpropanóides. Estas moléculas são parte de duas

grandes vias de sinalização de respostas de defesa, uma dependente de SA, e outra independente desse composto, mas dependente de etileno e JA (Montesano *et al.*, 2003).

Estudos de caracterização química e de isolamento de eliciadores, além de permitirem simular os eventos moleculares das vias de sinalização que ocorrem durante a interação planta-patógeno, também podem auxiliar a compreensão e caracterização de vias biossintéticas do metabolismo secundário vegetal. Atualmente, muitos estudos relacionados à produção de eliciadores sintéticos e utilização destes para indução de resistência a possíveis infecções têm sido relatados. A síntese de fragmentos mínimos ativos de glucanos e sua aplicação direta em plantas, sem a necessidade de causar injúrias no vegetal, têm potencialmente induzido à proteção de plantas contra o ataque de microrganismos (Ning *et al.*, 2003).

1.3 Elicidores fúngicos

Várias moléculas eliciadoras derivadas de componentes estruturais de fungos ou metabólitos por eles secretados têm sido isoladas e identificadas, incluindo oligossacarídeos, proteínas, glicoproteínas, lipídeos e até mesmo enzimas cuja atividade hidrolítica sobre a parede celular do hospedeiro leva à liberação de eliciadores endógenos. Oligossacarídeos e glicopeptídeos (Figura 2) derivados de parede celular de fungos são os eliciadores melhor caracterizados (Shibuya & Minami, 2001).

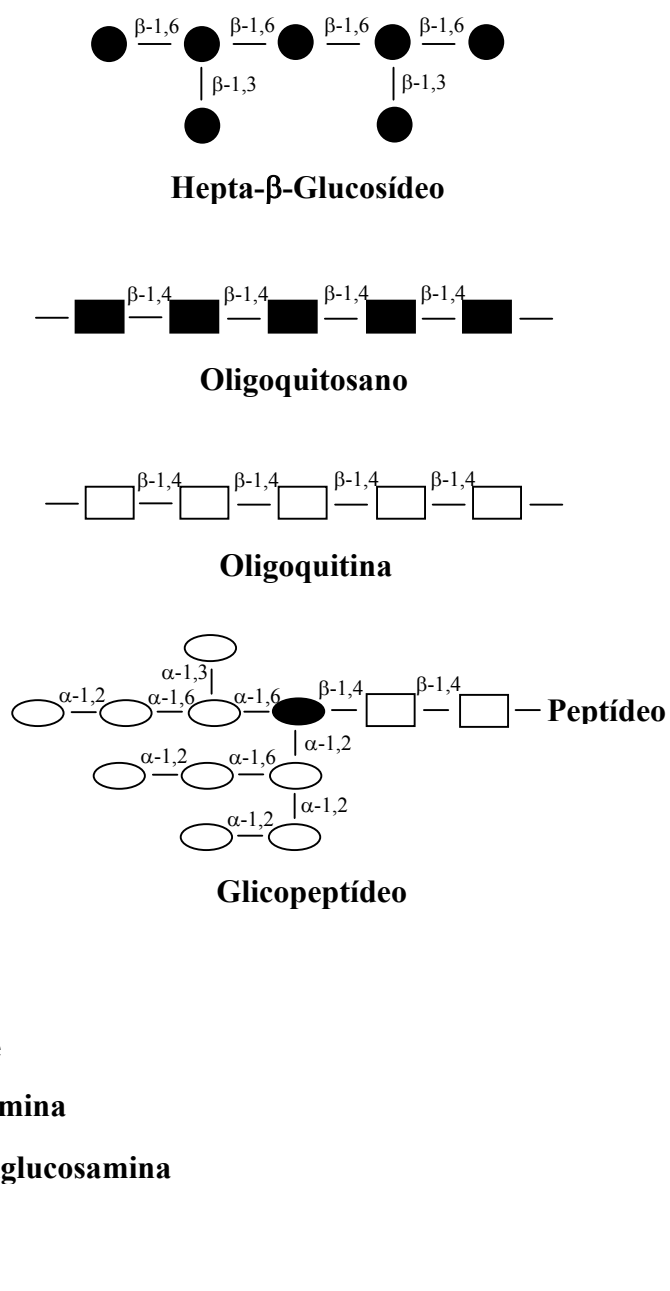


Figura 2. Estrutura dos principais eliciadores derivados da parede celular de fungos (Benhamou, 1996).

O eliciador mais potente e melhor estudado é o glucano de parede celular do fungo fitopatogênico *Phytophthora sojae*¹ (responsável pela podridão em tecidos do caule e da raiz de soja) caracterizado por Ayers *et al.* (1976a). A estrutura ativa desse eliciador é a de um hepta- β glucosídeo, derivado de um β -glucano, constituído de unidades de glucose β -1,6 ligadas, com ramificações na posição 3 (Cheong *et al.*, 1991). Um sítio específico de ligação para este heptassacarídeo foi identificado em membranas de soja e consiste em um complexo de 240 kDa com múltiplas subunidades, que se ligam a glucanos, conforme indicam estudos com fragmentos marcados com iodo radioativo (Cheong & Hahn, 1991). Uma subunidade de 75 kDa parece ser o principal sítio de ligação do hepta- β -glucosídeo. Hidrolisados do β -glucano do fungo *P. sojae* também agem como eliciadores em outras espécies de Fabaceae, o que demonstra a presença de sistemas de percepção similares nestas plantas (Cosio *et al.*, 1996).

Eliciadores com características estruturais e atividade indutora similar ao do glucano de *P. sojae* também têm sido descritos, como por exemplo, o β -glucano isolado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de induzir a síntese de gliceolinas em soja em concentrações nanomolares (Hahn & Albersheim, 1978).

Yamaguchi *et al.* (2000) identificaram um pentassacarídeo purificado por digestão enzimática de β -glucano isolado do fungo *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*), que possui alta atividade indutora de fitoalexinas em suspensões celulares de arroz. Este oligossacarídeo é constituído por unidades β -1,3 ligadas com ramificação na posição 6. Este β -glucano de *P. oryzae* não induz a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja. Do mesmo modo, os hepta- β -glucosídeos sintéticos, que possuem a estrutura química mínima necessária para a eliciação de fitoalexinas em tecidos de soja, não exercem atividade indutora de fitoalexinas em células de

¹ Anteriormente denominado *Phytophthora megasperma* var. *sojae*.

arroz, indicando a existência de diferenças no reconhecimento destes oligossacarídeos entre essas duas espécies vegetais.

Recentemente, Schweizer *et al.* (2000) identificaram um eliciador presente na superfície do conídio do fungo *Blumeria graminis*, o qual é rapidamente liberado e reconhecido no período de pré-penetração, durante a infecção em plantas de trigo, desencadeando a ativação de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR). A fração mais ativa deste eliciador reside em um heteroglucano, composto em maior proporção por unidades de glucose e contendo xilose e manose como componentes menores. Este eliciador também promove o acúmulo de PR em cevada, aveia, centeio, arroz e milho indicando que o mesmo é um determinante de respostas não específicas de defesa em cereais.

Outros eliciadores derivados da parede celular de fungos induzem a síntese de fitoalexinas e outras respostas de defesa em plantas. A quitina, um polímero comumente encontrado em parede celular de fungos, composto de unidades de N-acetilglucosamina β -1,4 ligadas, juntamente com seus fragmentos (N-acetiloligossacarídeos), têm a capacidade de ativar vários mecanismos de defesa em diferentes espécies vegetais. Quitosano (derivado desacetilado de quitina), outro componente encontrado em parede celular de fungos, e seus fragmentos, também têm sido descritos como moléculas eficazes no desencadeamento de respostas de defesa em plantas (Shibuya & Minami, 2001, Agrawal *et al.*, 2002). Recentemente, Khan *et al.* (2003) demonstraram que oligômeros de quitina e quitosano com grau de polimerização de 4-6 aumentaram a atividade das enzimas fenilalanina-amônia-liase (PAL) e tirosina-amônia-liase em folhas de soja, as quais são enzimas chaves na via dos fenilpropanóides.

Eliciadores ricos em resíduos de manose também têm sido descritos. Um polissacarídeo termoestável isolado de esporos de *Hemileia vastatrix* (fungo causador de ferrugem em café),

composto de 88 % de unidades de manose β -ligadas, induziu a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja e a resistência de cafeeiros à ferrugem (Guzzo & Moraes, 1997). Um glicopeptídeo, que contém de dez a doze unidades manosil, também foi descrito como um outro eliciador derivado de *S. cerevisiae*, sendo capaz de induzir a síntese da enzima PAL em células de tomate (Grosskoph *et al.*, 1991).

Um único microrganismo pode conter eliciadores de natureza química diversa. Estudos do patossistema arroz e de *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*) revelaram a presença de várias moléculas eliciadoras em micélios deste fungo (Schaffrath *et al.*, 1995, Yamaguchi *et al.*, 2002). Schaffrath *et al.* (1995) purificaram um eliciador glicoproteico derivado deste fungo, sendo sua atividade eliciadora associada à porção glicídica, que é composta principalmente por manose, com poucas unidades de glucose e galactose. Yamaguchi *et al.* (2002) utilizaram dois oligossacarídeos purificados da parede celular de *P. oryzae*, um n-acetilquitoheptaose e um tetra-glucosil glucitol para indução de fitoalexinas em suspensões celulares de arroz. Os autores notaram que os dois eliciadores quando aplicados simultaneamente nas culturas de arroz produziram um efeito sinérgico, aumentando a biossíntese da fitoalexina momilactona A. Umemura *et al.* (2002) estudaram a atividade de um glicosfingolipídeo (cerebrosídeo), também isolado de *P. oryzae*, em suspensões celulares de arroz, e do mesmo modo verificaram um efeito sinérgico com oligômeros de quitina na indução das fitoalexinas momilactonas e fitocassenos.

Uma glicoproteína de 42 KDa purificada de *P. megalasperma* (= *P. sojae*) elicia o acúmulo de fitoalexinas em células de salsinha. Um peptídeo com uma sequência de 13 aminoácidos (Pep-13) foi identificado nesta glicoproteína, sendo uma molécula suficiente para estimular a mesma resposta de defesa da glicoproteína intacta. Estudos com Pep-13 marcado com iodo radioativo no resíduo tirosina Tyr-12 mostraram a presença de um complexo protéico de 91 KDa na membrana

plasmática de células de salsinha com alta afinidade por esta molécula. Substituições dos resíduos Trp-2 ou Tyr por resíduos de alanina ocasionaram redução da atividade eliciadora de respostas de defesa (Nürnberger *et al.*, 1994; 1995).

Várias espécies de *Phytophthora* também secretam uma classe de proteínas altamente conservadas de aproximadamente 10 KDa chamadas de elicitinias, as quais induzem respostas de defesa em plantas. De acordo com a sua toxicidade, as elicitinias são classificadas em: α -elicitinias ácidas, que são menos tóxicas e incluem a capsiceína e parasiticeína, e as β -elicitinias básicas que são mais tóxicas e incluem a criptogeína e a cinamomina (Cervone *et al.*, 1997). A aplicação de elicitinias puras em tabaco causou resposta de hipersensibilidade, com morte de diversas células e aumentou a resistência à infecção por fungos (Yu, 1995). Estudo realizado com suspensões celulares de tabaco tratadas com criptogeína demonstrou que esta elicitina induziu a produção de espécies reativas de oxigênio e a alcalinização do meio de cultura (Viard *et al.*, 1994).

1.4 Elicidores derivados de plantas

Elicidores derivados da parede celular vegetal (eliciadores endógenos) foram caracterizados como oligogalacturonídeos (OGAs) (Hahn *et al.*, 1981), moléculas lineares constituídas de 2 a 20 unidades de α -1,4-D - ácido galacturônico (Nothnagel *et al.*, 1983; Ridley *et al.*, 2001). Esses oligômeros usualmente são liberados por ação de endopoligalacturonases (EPG) e pectato-liases derivadas de patógenos, enzimas que degradam pectinas, que são os primeiros alvos atacados por microrganismos invasores na tentativa de transpor a parede celular do hospedeiro e penetrar na célula vegetal. OGAs com grau de polimerização (GP) entre 8 e 15 têm demonstrado forte atividade eliciadora em várias plantas (Côté & Hahn, 1994); oligômeros com GP menor são fracos indutores de respostas de defesa.

A ação de EPGs derivadas de microrganismos é regulada por proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) presentes na parede celular de plantas. Estudos *in vitro* demonstraram que EPGs fúngicas catalisam a degradação de pectinas a oligômeros inativos em 15 minutos. Entretanto, na presença das PGIPs essa degradação leva à produção de OGAs ativos, sendo que a hidrólise em OGAs menores e inativos ocorre somente após 48 horas (Cervone *et al.*, 1989). Esses resultados indicam que estas proteínas possibilitam as plantas converterem um fator de patogenicidade em um sinal para ativar seus mecanismos de defesa.

OGAs induzem uma grande variedade de respostas de defesa em plantas, incluindo o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese, a síntese de lignina e a eliciação de necrose (Cervone *et al.*, 1997). Respostas iniciais, que são parte do sinal de transdução de OGAs, como o influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^{+} , também têm sido descritas (Cervone *et al.*, 1997). Recentemente foi demonstrado que OGAs induzem uma rápida e breve produção de H_2O_2 em células de *Vitis vinifera*, seguida da expressão diferencial de nove genes de defesa, além de estimular a atividade de quitinases e β -1,3 glucanases. Nas folhas dessa espécie, os OGAs reduziram em cerca de 55-65% a infecção causada pelo fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* (Aziz *et al.*, 2004).

Spiro *et al.* (1998), trabalhando com cultura de tecidos de tabaco, utilizaram OGAs que tiveram o C-1 do terminal redutor modificado, através de ligação covalente a biotina ou a tiamina, redução a álcool primário ou oxidação enzimática a ácido carboxílico. A atividade biológica desses quatro OGAs modificados foi reduzida quando comparada ao tratamento das culturas com OGAs não modificados, o que demonstrou que o terminal redutor pode ser um importante elemento no reconhecimento destes oligômeros no sistema estudado. O modo de ação dos OGAs na indução da síntese de metabólitos de defesa ainda não é bem conhecido. Alguns

estudos com membranas isoladas de células de tomate indicam que talvez haja uma interação de oligômeros com GP entre 13 e 26 com a membrana plasmática (Reymond *et al.*, 1995). Entretanto, estes fragmentos pépticos não são específicos, sendo o tamanho do oligômero, sua natureza policatiónica e a forma molecular fatores importantes para a sua atividade.

1.5 Moléculas supressoras

Muitos microrganismos conseguem crescer sobre tecidos vegetais a despeito da capacidade da planta hospedeira em perceber-los e ativar seus mecanismos de defesa. Isso decorre do fato de muitos patógenos terem desenvolvido, ao longo da evolução, estratégias para sobrepujar as respostas de defesa das plantas. Parte dessas estratégias está relacionada à liberação de moléculas supressoras que inibem a reação de defesa das plantas, tornando-as suscetíveis até mesmo a microrganismos avirulentos e não patogênicos (Knogge, 1996). Muitos supressores da resposta de resistência de plantas a patógenos têm sido descritos, diferindo em suas características químicas e seu modo de ação. Alguns parecem interferir na ligação do eliciador ao receptor, outras na transdução de sinais, na ativação gênica e até mesmo na atividade dos fatores de defesa (Shiraishi *et al.*, 1994).

Assim como as plantas, que apresentam moléculas inibidoras de endopoligalacturonases fúngicas, os fungos, em coevolução, também secretam inibidores da ação de β -glucanases e quitinases vegetais. Essas enzimas despolimerizam polissacarídeos de parede celular do micélio de fungos, gerando oligossacarídeos indutores de respostas de defesa, em adição àqueles liberados naturalmente durante a germinação dos esporos e crescimento das hifas fúngicas. Um inibidor protéico (GIP) da atividade de endo- β -1,3-glucanase de soja, derivado de culturas de *P. sojae*, foi recentemente caracterizado. O GIP-1 apresenta afinidade por uma isoforma das duas

proteínas relacionadas a patogênese encontradas em sementes de soja e suprime a resposta de defesa mediada pelo glucano do fungo (Ham *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 2002).

Supressores liberados pelo patógeno na interação entre ervilha e *Mycosphaerella pinodes* foram caracterizados como supressinas A e B. Estas glicoproteínas inibem a síntese da fitoalexina pisatina em concentrações μM e quando as duas são co-aplicadas apresentam efeito sinérgico, induzindo a suscetibilidade em plantas resistentes a espécies de fungos que são avirulentas para elas (Smith, 1996).

Na interação compatível entre batata e *Phytophthora infestans*, glucanos ramificados, de baixo peso molecular, parecem ser responsáveis pela supressão do acúmulo de fitoalexinas sesquiterpenoídicas. Como a estrutura desses glucanos não é muito diferente daqueles descritos como eliciadores, foi sugerido que sua ação poderia ser por competição com os eliciadores pelo sítio receptor (Smith, 1996).

Mithöfer *et al.* (1996) demonstraram que β 1,6-1,3-glucanos cíclicos secretados pela bactéria fixadora de nitrogênio *Bradyrhizobium japonicum* agem como supressores da indução de fitoalexinas em soja. Essa supressão está possivelmente relacionada à capacidade da bactéria associar-se simbioticamente à planta, sem desencadear a produção de substâncias de defesa.

Algumas moléculas do próprio hospedeiro, liberadas em resposta a infecção, também podem agir como supressores de mecanismos de defesa. A atividade de um eliciador não específico obtido de *Cladosporium fulvum* pode ser suprimida por fluidos intracelulares de folhas infectadas de tomate. A supressão da atividade deste eliciador parece estar relacionada à ação de enzimas do próprio hospedeiro sobre o eliciador do fungo, reduzindo a meia vida do mesmo através de processo degradativo (Peever & Higgins, 1989). Moerschbacher *et al.* (1999), ao ensaiarem simultaneamente o eliciador do fungo *Puccinia graminis* e fragmentos pécticos,

constatarem efeito supressor de mecanismos de resistência em trigo pelos fragmentos (OGAs) com pequeno grau de polimerização, sendo estes considerados como supressores endógenos.

1. 6 Estudos da indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (Glycine max)

A interação entre o fungo *Phytophthora sojae* (= *P. megasperma*) e soja tem sido um excelente modelo para elucidar aspectos moleculares da interação planta-patógeno. As plantas de soja são muito sensíveis a diversos eliciadores obtidos de microrganismos, sendo dessa forma, uma ferramenta importante para o estudo de moléculas indutoras da síntese de fitoalexinas (Pellicice *et al.*, 2000).

O ensaio em cotilédones de soja descrito por Ayers *et al.* (1976b), tem sido extensivamente utilizado para detecção de atividade indutora da síntese de fitoalexinas por microrganismos sapróbios e fitopatogênicos, assim como para estudos da sinalização molecular na resistência raça-específica com *P. sojae* e seus eliciadores (Hahn & Albersheim, 1978, Boué *et al.*, 2000; Abbasi *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001). Os cotilédones de soja apresentam arquitetura ideal para estes estudos, pois são constituídos de células uniformes, alinhadas em colunas de forma compacta, o que permite medir a resposta celular e a comunicação célula-célula durante as interações nos tecidos infectados (Graham, 1995).

As gliceolinas constituem o maior grupo de fitoalexinas produzido por plantas de soja. Tratam-se de pterocarpanos derivados em parte da via dos fenilpropanóides, ocorrendo em uma série de isômeros (I-IV) (Paxton, 1995) (Figura 3). Durante a infecção, conjugados de isoflavonas pré-formados (malonilglucosil-daidzeína e malonilglucosil-genisteína), comumente encontrados nos tecidos de soja, são hidrolisados liberando daidzeína, o primeiro precursor das gliceolinas e genisteína, que possui atividade inibidora do crescimento de *P. sojae* (Park *et al.*, 2001).

Geralmente, a indução de gliceolinas nos tecidos de soja é acompanhada por uma intensa coloração vermelha no ponto de infecção com o patógeno ou no tratamento com eliciadores. Esta coloração se deve à presença de pterocarpanos precursores das gliceolinas, como por exemplo, o glicinol.

1.7 O fungo *Mucor ramosissimus*

O gênero *Mucor* pertence à família Mucoraceae, da ordem dos Mucorales dentro da classe dos Zigomicetos. *Mucor* é um fungo filamentoso encontrado no solo, em plantas, e em matéria vegetal morta (Ellis, 1997). *Mucor ramosissimus* Samutsevitch é um fungo sapróbio, isolado da superfície de folhas de rubiáceas nativas tropicais. A Figura 4 ilustra um aspecto geral da colônia de *M. ramosissimus* e esquemas da estrutura de esporos e esporangióforos de espécies do gênero. Alguns relatos descrevem este fungo como causador de zigomicoses em pacientes imunodeprimidos (Ellis, 1997). Esse fungo também possui a capacidade de degradar pesticidas químicos (Szewczyk *et al.*, 2003).

Suspensões de esporos vivos ou autoclavados obtidos de *M. ramosissimus* induzem a síntese de gliceolinas em cotilédones de soja e em rubiáceas nativas tropicais (Cordeiro Neto & Dietrich; 1992; Pelicice *et al.* 2000). Garcez *et al.* (2000) comparam a atividade indutora de esporos deste fungo com o de outro fungo sapróbio (*Rhizopus sp.*) e verificaram que apenas *M. ramosissimus* possui capacidade de induzir gliceolinas em sementes de cultivares de soja. Estudos preliminares mostraram que esse eliciador possui estabilidade e capacidade indutora semelhantes aos β -glucanos derivados de *P. sojae* e *S. cerevisiae*.

Recentemente, Silva & Braga (2004) sugeriram que oligogalacturonídeos derivados de rubiáceas tropicais com pequeno grau de polimerização parecem suprimir a atividade indutora de

gliceolinas do eliciador de *M. ramosissimus* em cotilédones de soja. Resultados similares foram relatados por Moerschbacher *et al.* (1999) em estudos da supressão da resposta de defesa em trigo. Dessa forma, a elucidação da estrutura química do eliciador de *M. ramosissimus* é de grande importância para o estudo do seu modo de ação, bem como para entender a supressão de sua atividade indutora por oligogalacturonídeos com baixo grau de polimerização e para estudos dos eventos que ocorrem em interações inespecíficas entre plantas e microrganismos.

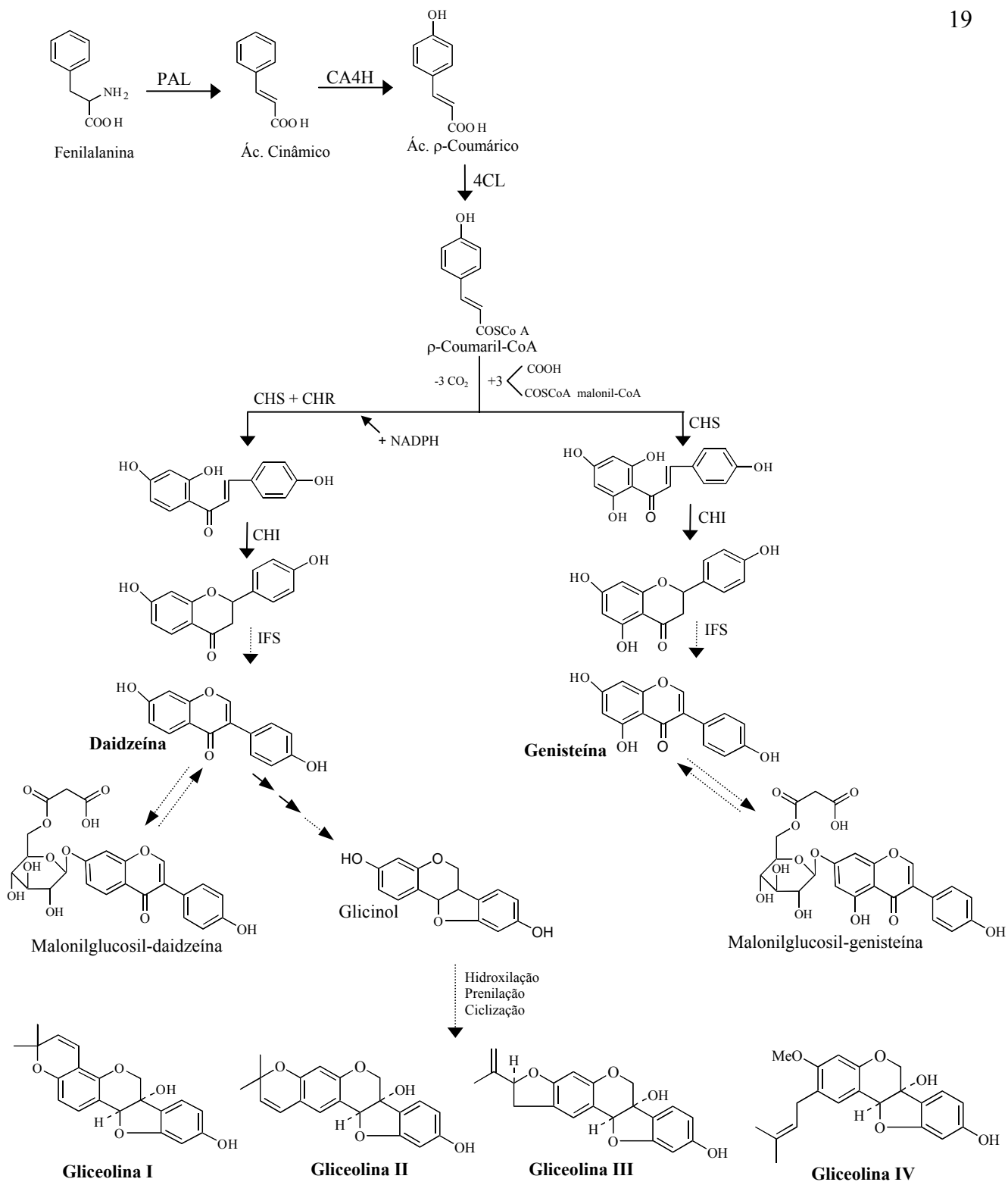


Figura 3. Biossíntese de isoflavonas (daidzeína e genisteína) e pterocarpanos (gliceolinas) em soja (Dixon & Paiva, 1995). PAL, fenilalanina amônia liase; CA4H, ácido cinâmico 4-hidroxilase; 4CL, 4 coumarato: coenzima A ligase; CHS, chalcona sintase; CHR, chalcona redutase; CHI, chalcona isomerase; IFS, isoflavona sintase.

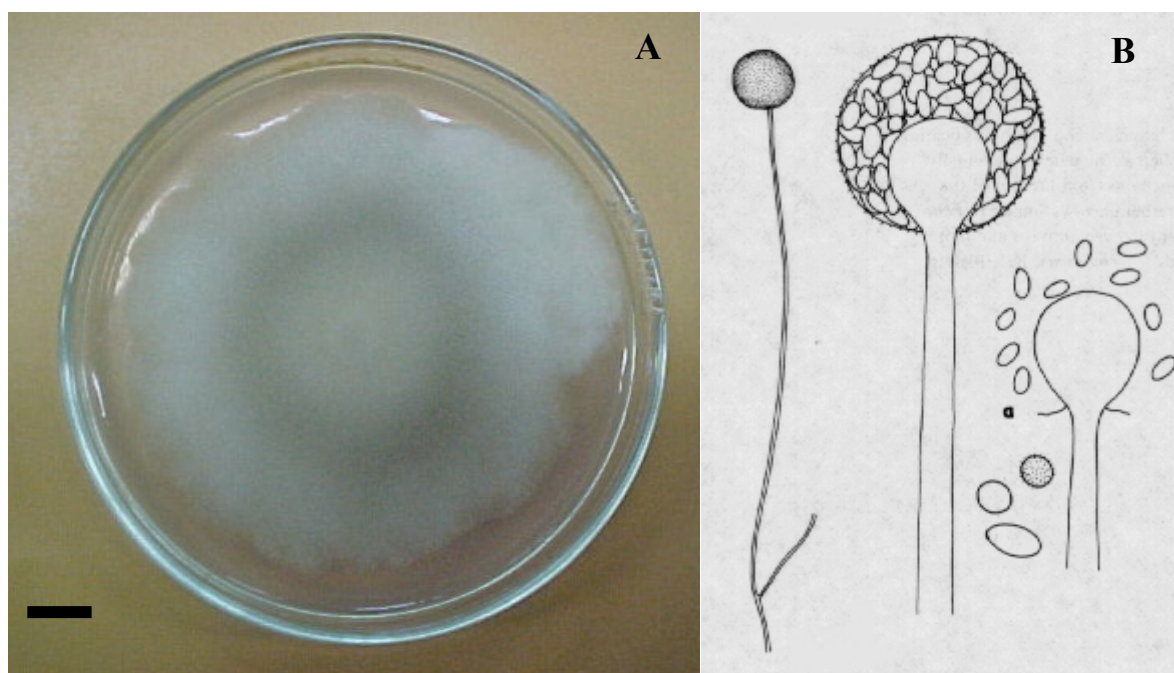


Figura 4. (A) Aspecto geral da colônia de *Mucor ramosissimus* crescida em meio Synthetic-Mucor-Agar (SMA) com 5 dias de idade (barra = 1 cm). (B) Desenho esquemático de *Mucor* spp., ilustrando da esquerda para a direita: esporangióforos, esporângio multiesporulado (30-300 μm), columela e esporos (4-8 μm) (Ellis, 1997).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos purificar e caracterizar quimicamente o eliciador de *M. ramosissimus* e estudar a supressão de sua atividade indutora da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja por oligogalacturonídeos com pequeno grau de polimerização.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura do fungo

Inóculos do fungo *Mucor ramosissimus* Samutsevitsch (URM 3106)² mantido em meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) Difco no escuro a 28° C por 10 dias foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio SMA (Synthetic-*Mucor*-Ágar), que favorece a esporulação de espécies de *Mucor* (Schipper, 1973). O meio SMA é composto de glucose (40 g/L), asparagina (2g/L), KH₂PO₄ (0,5 g/L), MgSO₄ (0,25 g/L), tiamina (0,05 mg/L) e ágar bacteriológico (10 g/L). As culturas foram mantidas em SMA no escuro a 28°C e renovadas a cada 15 dias.

3.2 Obtenção do eliciador a partir de esporos

Para obtenção do eliciador, 20 mL de água destilada estéril foram adicionados a cada cultura do fungo crescido em meio SMA, em condições assépticas, sendo os esporos de *M. ramosissimus* suspensos com auxílio de um pincel autoclavado. Após serem coletadas com pipeta Pasteur e filtradas em gaze e náilon, as suspensões foram centrifugadas a 318 g por 10 min, sendo o sobrenadante descartado para eliminação de açúcares solúveis provenientes do meio de cultura e os esporos re-suspensos em água deionizada. Em seguida, a suspensão de esporos foi autoclavada por 30 min a 121 °C e 1,5 atm e o sobrenadante foi coletado por centrifugação a 6000 g por 30 min a 5 ° C, sendo o resíduo descartado. Esta fração sobrenadante foi submetida a

² Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE.

quantificação de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) tendo glucose como padrão e a medida de atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja (item 3.6).

3.3 Purificação parcial do eliciador por precipitação etanólica

A metodologia utilizada para precipitação etanólica do eliciador foi aquela descrita por Cordeiro Neto & Dietrich (1992). O sobrenadante obtido após autoclavagem de esporos (item 3.2) foi concentrado em roto-evaporador a 1/10 do volume inicial e precipitado com 5 volumes de etanol absoluto por 72 h a 5°C. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 10.000 g, por 30 min a 5° C, lavado por 2 vezes em etanol e retomado em água deionizada autoclavada (10 mL), sendo denominado de eliciador concentrado, o qual foi posteriormente submetido à dosagens de carboidratos feitas pelo método colorimétrico fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), tendo glucose como padrão. A quantificação de proteínas também foi realizada, utilizando como padrão albumina de soro bovino (Bradford, 1976). Para avaliação da atividade indutora de fitoalexinas, alíquotas do eliciador concentrado foram ensaiadas em cotilédones de soja, conforme descrito no item 3.6 e o restante foi armazenado em congelador a -20 °C até utilização para etapas de fracionamento.

3.4 Determinação de parâmetros de crescimento, esporulação e atividade indutora de M. ramosissimus cultivado em SMA

Inóculos de 6 mm de diâmetro, obtidos a partir de culturas de *M. ramosissimus* em SMA com 7 dias de idade, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo 20 mL de SMA para iniciar culturas que foram utilizadas para a determinação da curva de crescimento do fungo.

O crescimento radial de micélio foi utilizado como parâmetro para determinar a curva, sendo avaliado diariamente com auxílio de uma régua milimetrada até as culturas atingirem o diâmetro completo das placas de Petri (9 cm).

Para o estabelecimento da curva de esporulação, cerca de 45 culturas foram repicadas conforme descrito para a curva de crescimento. Diariamente, (até 15º dia de cultivo), 3 placas tiveram seus esporos extraídos conforme descrito no item 3.2. Alíquotas das suspensões de esporos obtidas de cada cultura foram retiradas para contagem de esporos, que foi realizada em câmara de Newbauer sob microscópio óptico.

As suspensões de esporos das 3 placas, obtidas para cada dia, foram reunidas de acordo com a idade das culturas, autoclavadas para a extração do eliciador (item 3.2) e utilizadas para a obtenção do eliciador concentrado conforme item 3.3. Cada eliciador concentrado, obtido das culturas com diferentes idades, foi submetido a dosagens de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), sendo posteriormente (6º ao 15 º dia de cultivo) ensaiado quanto à sua atividade eliciadora de fitoalexinas em cotilédones de soja (item 3.6).

3.5 Curva Dose-resposta

Para o estudo dos efeitos da concentração do eliciador na indução de gliceolinas em cotilédones de soja, uma curva dose-resposta foi realizada com o eliciador concentrado, derivado de autoclavados de esporos de *M. ramosissimus*, obtido de acordo com os itens 3.2 e 3.3. O eliciador foi ensaiado em cotilédones de soja em concentrações de 0 a 200 µg equivalentes de glucose / mL, de acordo com o item 3.6.

3.6 Bioensaio de atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja

O bioensaio com cotilédones de soja foi realizado segundo procedimento modificado a partir de Ayers *et al.* (1976b). Para medida de atividade indutora do eliciador, foram utilizados cotilédones destacados de plântulas de soja (cultivar IAC-18) com 8-10 dias, cultivadas em bandejas plásticas, contendo terra vegetal e vermiculita em camadas conforme descrito por Pelicice *et al.* (2000), mantidas em casa de vegetação sob fotoperíodo natural à temperatura ambiente. Os cotilédones foram desinfetados em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10%, durante 10 minutos e, posteriormente, lavados abundantemente com água destilada estéril. Em câmara de fluxo laminar, discos de 8 mm de diâmetro e cerca de 1 mm de espessura foram retirados da superfície adaxial de cada cotilédone com o auxílio de um furador de rolhas e um bisturi. Os cotilédones (em grupos de cinco) foram colocados em placas de Petri com papel de filtro umedecido com 3 mL de água destilada. Exceto para a curva dose-resposta (item 3.5), nos demais ensaios o eliciador foi diluído a uma concentração de 50 µg equivalentes de glucose / mL, sendo aplicadas gotas de 50 µL (2,5 µg equivalentes de glucose /cotilédone) do eliciador sobre a superfície cortada de cada cotilédone. Como controle negativo foram aplicados 50 µL de água destilada estéril em cada cotilédone e como controle positivo foi utilizado, na maioria dos ensaios, o β-glucano isolado do fungo *Phytophthora sojae* de acordo com Hahn *et al.* (1992), doado pelo Dr. M. G. Hahn (University of Georgia - USA), na concentração de 0,1 µg equivalente de glucose/cotilédone. Os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando 15 cotilédones por tratamento. Após 20 horas de incubação no escuro a 25 °C, os cotilédones foram lavados com água destilada (1 mL /cotilédone), sendo as soluções obtidas filtradas em papel de filtro e lidas em espectrofotômetro a 286 nm, para a estimativa da produção de fitoalexinas (gliceolinas), que são detectadas neste comprimento de onda.

3.7 Extração de gliceolinas dos difusatos de soja e detecção por HPLC

Os difusatos obtidos dos cotilédones de soja conforme descrito no item 3.6 foram submetidos à partição com mesmo volume de acetato de etila por 3 vezes. As frações orgânicas obtidas foram reunidas, desidratadas por filtração em sulfato de sódio anidro, secas a 40-45°C e retomadas em metanol na razão 500 µL/ 15 cotilédones. Após serem filtradas em filtros Millipore de 45 µm, as amostras foram aplicadas (20 µL) em coluna C18 em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) Varian, sendo a separação realizada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em acetonitrila (eluente A) e 0,1% TFA em água (eluente B) em gradiente de: 0-5 min 20% de A, 5-50 min 20-60 % de A, 50-52 min até 100% de A, 52-57 min 100% de A e 57-65 min 20% de A (Pelicice *et al.* 2000). Para confirmação da presença das gliceolinas foi utilizado um difusato da cultivar de soja Williams 83, gentilmente cedido pelo Dr. Michael G. Hahn (University of Georgia - USA). Para quantificação de daidzeína e genisteína foram utilizados padrões comerciais. A daidzeína foi utilizada para a quantificação de gliceolinas, uma vez que não existem padrões destes metabólitos no mercado.

3.8 Purificação e caracterização do eliciador de *M. ramosissimus*

Foram utilizadas 300 culturas do fungo *M. ramosissimus* com 9 dias de cultivo, as quais tiveram seus esporos extraídos e autoclavados para a obtenção do eliciador de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.2 e 3.3. A Figura 5 mostra um fluxograma com o resumo das principais etapas desse processo.

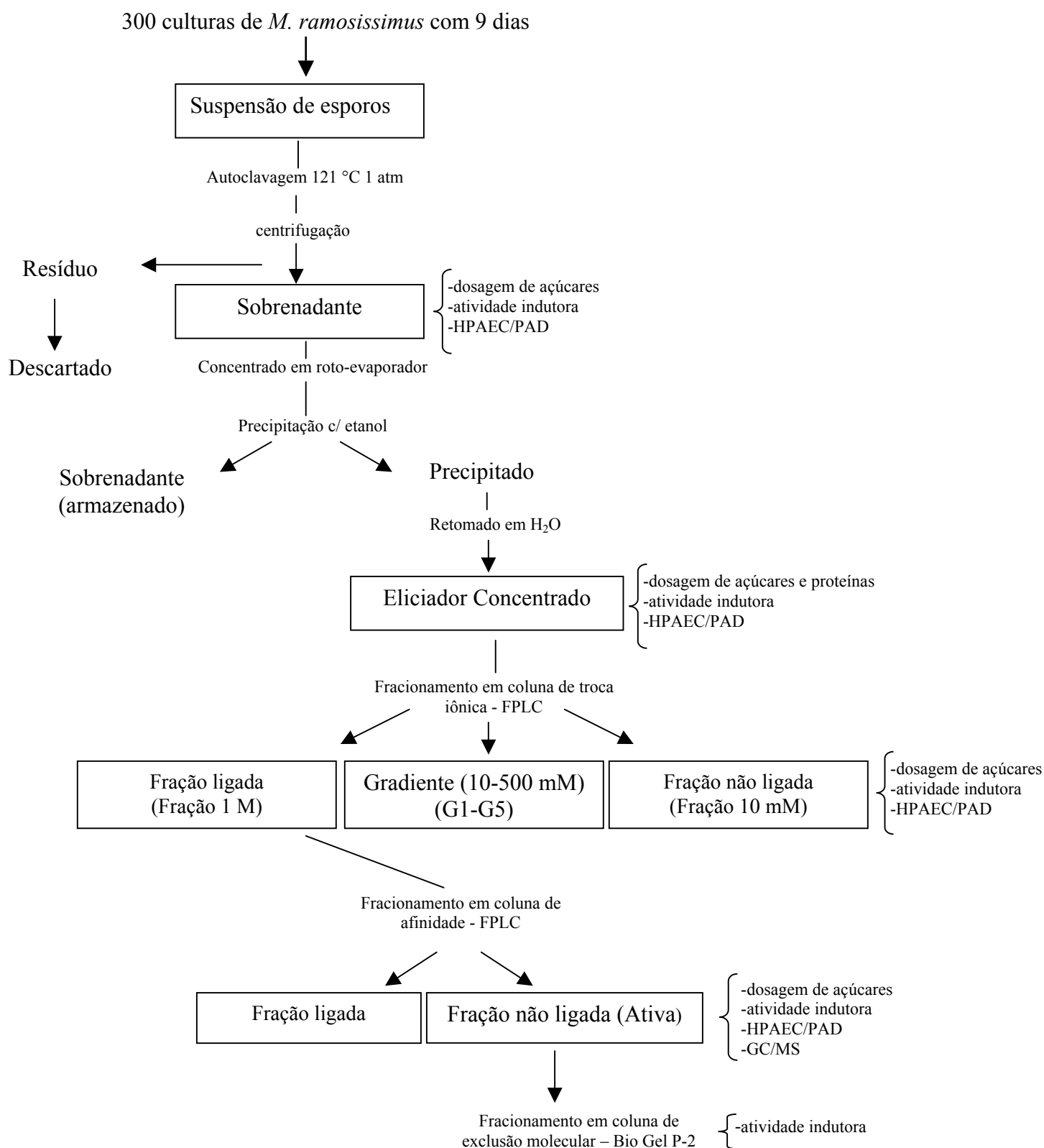


Figura 5. Etapas do processo de purificação do eliciador de *M. ramosissimus*.

3.8.1 Cromatografia de troca iônica – Hi Trap Q Sepharose

O eliciador concentrado, obtido conforme itens 3.2 e 3.3 foi aplicado em coluna de troca aniônica Hi Trap Q Sepharose da Pharmacia em sistema de FPLC Pharmacia (Fast Performance Liquid Chromatography). A separação foi efetuada por eluição isocrática durante 10 minutos com tampão bicarbonato de amônio 10 mM pH 9,0, seguida de gradiente linear de 10 a 500 mM de 11 a 50 minutos e eluição isocrática por 10 minutos 1M com o mesmo tampão, a temperatura ambiente. As frações obtidas foram monitoradas por absorbância a 280 nm para a detecção de proteínas e também foram analisadas quanto à presença de carboidratos, através de ensaio colorimétrico pelo método do fenol-sulfúrico a 490 nm (Dubois *et al.*, 1956). As frações foram reunidas de acordo com o perfil de carboidratos, liofilizadas e retomadas em 1 mL de água destilada. O conteúdo de carboidratos dessas frações reunidas foi novamente quantificado pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e 2,5 µg equivalentes de glucose dessas frações foram aplicadas em cada cotilédone para detecção de atividade eliciadora de fitoalexinas (item 3.6). Aliquotas dessas frações foram analisadas quanto a sua composição em monossacarídeos neutros por HPAEC/PAD (item 3.10).

3.8.2 Cromatografia de afinidade – Sepharose Concanavalina A

Aliquotas da fração ativa resultante da etapa de fracionamento em coluna Hi Trap Q Sepharose Pharmacia, após liofilização, foram diluídas em tampão Tris 10 mM pH 7,4, contendo 150 mM de NaCl e 1 mM de CaCl₂, MgCl₂ e MnCl₂ (1mM) e submetidas a cromatografia em coluna de afinidade Sepharose Con-A em sistema de FPLC Pharmacia. Inicialmente foram aplicados 10 mL do tampão Tris 10 mM para eluição do material sem afinidade pela matriz,

seguidos de 5 mL de uma solução de 4% de α -metil-manopiranosídeo no mesmo tampão para retirada do material ligado ao gel. As frações foram monitoradas quanto à presença de proteínas por absorbância a 280 nm. As frações retida e não retida no gel foram dialisadas contra água destilada (limite de exclusão de 1000), liofilizadas, solubilizadas em água deionizada e posteriormente submetidas a dosagens de carboidratos (método fenol-sulfúrico, Dubois *et al.*, 1956), a avaliação de atividade indutora de fitoalexinas (item 3.6), análise de composição em monossacarídeos por HPAEC/PAD e GC/MS (item 3.10) e análise de ligação glicosídica (item 3.11).

3.8.3 Cromatografia de exclusão molecular – Bio Gel P-2

Para avaliação da massa molecular média aparente da fração ativa contendo o eliciador de *M. ramosissimus* proveniente da coluna de afinidade, foi utilizada uma coluna Bio Gel P-2 Bio Rad com faixa de separação de 100-1800 Da, contendo um volume de 19 mL e fluxo de 0,4 mL/min. As frações foram eluídas em água destilada e submetidas às análises descritas no item 3.6. A coluna foi calibrada com padrões comerciais, sendo utilizados Blue Dextran, maltoheptaose, maltotetraose e sacarose (1 mg cada).

3.9 Tratamento do eliciador de *M. ramosissimus* com protease e periodato de sódio

Frações ativas provenientes da coluna Hi Trap Q Sepharose e referentes a eluição de 10-500 mM com bicarbonato de amônio foram reunidas em uma única fração, a qual foi liofilizada, retomada em 1 mL de água destilada e submetida a quantificação de carboidratos (Dubois *et al.*, 1956) e de proteínas (Bradford, 1976). Aliquotas desta fração foram utilizadas para o tratamento

com protease, que causa a digestão de seqüências peptídicas abolindo a atividade de proteínas, e com periodato de sódio que causa a degradação de carboidratos.

Para o tratamento com protease, uma alíquota de 100 µL desta fração contendo 50 µg equivalentes de glucose e 2 µg de proteínas foi incubada por 24 horas a 30 °C com 900 µL de protease derivada de *Streptomyces griseus* Sigma (4,1 unidades/ mL) em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. Após a incubação, a mistura foi aquecida por 2 minutos a 100°C.

Para o tratamento com periodato de sódio, outra alíquota de 100 µL da mesma fração, contendo a mesma quantidade de carboidratos e proteínas descrita acima foi incubada por 24 horas a 30 °C com 900 µL de periodato de sódio Merck 70 mM. No final da incubação foram adicionados à mistura 10 µL de polietilenoglicol para a destruição do excesso de periodato de sódio.

Em ambos os tratamentos foram feitos controles com o mesmo procedimento, sendo utilizada água destilada em substituição ao eliciador. As alíquotas tratadas com protease e periodato de sódio, assim como os controles para cada tratamento foram ensaiados em cotilédones de soja para medida de atividade indutora de fitoalexinas, conforme item 3.6.

3.10 Análise de composição do eliciador por HPAEC/PAD e GC/MS

Alíquotas de 100 µg equivalentes de glucose das frações obtidas pelas etapas preliminares de purificação do eliciador de *M. ramosissimus* (itens 3.2 e 3.3) e pelas separações cromatográficas em coluna de troca iônica e de afinidade foram hidrolisadas com 1 mL de TFA 2N em ampolas seladas por 1 h a 121°C em autoclave. Após evaporação do ácido, as amostras foram dissolvidas em água deionizada, filtradas em filtros Millipore 45 µm e analisadas por

cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em coluna Carbo-Pac PA1 em sistema Dionex DX-500. Os monossacarídeos neutros foram eluídos isocraticamente com 12 mM de NaOH e identificados por comparação dos tempos de eluição com padrões comerciais de monossacarídeos.

A fração ativa resultante da purificação do eliciador de *M. ramosissimus* por cromatografia de afinidade (item 3.8.2) foi analisada quanto à sua composição em açúcares ácidos e neutros pela preparação de derivados sililados. A amostra foi hidrolisada em ácido trifluoroacético (TFA) 2N por 1 h a 121°C. Após evaporação do ácido em speed-vac, a amostra foi retomada em água destilada, seca em liofilizador e sililada conforme metodologia descrita por York *et al.* (1985). Os derivados sililados foram resolvidos em coluna HP-1 em GC/MS tendo *mio*-inositol como padrão interno, sob as seguintes condições: 160°C por 3 minutos, aumentando a temperatura até 260°C a 10°C/min. Os monossacarídeos encontrados nas amostras foram comparados aos monossacarídeos comerciais submetidos ao mesmo tratamento.

3.11 Análise de ligação glicosídica

Uma alíquota da fração ativa isolada em coluna Concanavalina-A foi enviada ao laboratório do Dr. Michael G. Hahn no Complex Carbohydrate Research Center (University of Georgia – USA) para análise de ligação glicosídica. A amostra foi primeiramente permetilada, despolimerizada, reduzida e acetilada, sendo os alditóis acetato parcialmente metilados analisados em cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS) conforme descrito por York *et al.* (1985).

3.12 Obtenção de oligogalacturonídeos

Para obtenção de oligogalacturonídeos com diferentes graus de polimerização (GP) foram utilizados ácido poligalacturônico e pectina comerciais. Dez gramas de pectina de *Citrus* Difco foram hidrolisadas com 1 L de ácido trifluoacético 2N, a 85 °C, por 4 h, conforme metodologia descrita por Nothnagel *et al.* (1983). Após filtração deste material através de filtros de microfibras de vidro Whatman (GF/A), o filtrado foi seco em roto-evaporador para eliminação do ácido, sendo posteriormente retomado em água deionizada.

Quinhentos mg de ácido poligalacturônico Sigma foram solubilizados em 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e submetidos a hidrólise exaustiva (24 h) a 30°C com 20 µL de endopoligalacturonase (EPG) Megazyme. Após incubação com a enzima, o material foi fervido a 100 °C por 2 min e precipitado com 4 volumes de etanol absoluto a 4°C. O sobrenadante foi coletado por centrifugação e posteriormente seco e retomado em água deionizada.

Após quantificação de ácidos urônicos por ensaio colorimétrico, tendo ácido galacturônico como padrão (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), amostras dos hidrolisados de ácido poligalacturônico e de pectina de *Citrus* foram submetidas a análises por HPAEC/PAD em sistema Dionex DX-500 em coluna Carbo-Pac PA-1, com gradiente de acetato de sódio 400-800 mM em 100 mM de hidróxido de sódio, por 60 minutos (Spiro *et al.*, 1993). Os picos foram identificados por comparação com padrões de oligogalacturonídeos de GP 1-4 e 7-20, fornecidos, respectivamente, pelo Dr Stephen Fry (University of Edinburgh – UK) e Dr Stephan Ebehard (University of Georgia - USA).

3.13 Isolamento de oligogalacturonídeos

Dois mg de oligogalacturonídeos (OGAs) de grau de polimerização de 2-5, obtidos por hidrólise exaustiva (24 h) de ácido poligalacturônico Sigma com endopoligalacturonase (EPG), foram aplicados em coluna Bio Gel P-2 Bio Rad para separação de acordo com sua massa molecular média aparente. A coluna foi inicialmente calibrada com padrões comerciais, sendo utilizados Blue Dextran, maltoheptaose, maltotetraose e sacarose (1 mg cada) e os oligogalacturonídeos eluídos em água destilada. Após detecção de ácidos urônicos por ensaio colorimétrico (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), as frações obtidas foram analisadas por HPAEC/PAD em Sistema Dionex DX-500 em coluna Carbo-Pac PA1 (item 3.10) conforme descrito por Spiro *et al.* (1993).

3.14 Ensaios de supressão da atividade indutora de *M. ramosissimus* por oligogalacturonídeos

Oligogalacturonídeos com pequeno grau de polimerização (GP 2-5), obtidos por hidrólise com EPG e por fracionamento em coluna Bio Gel P-2, foram utilizados em ensaios de competição com eliciador de *M. ramosissimus* para estudo do efeito supressor destas moléculas (OGAs) na indução da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja. Os OGAs foram utilizados nas proporções 1:1 e 2:1 do eliciador (50 e 100 µg/mL de OGA para 50 µg/mL do eliciador de *M. ramosissimus*, respectivamente) e ensaiados em cotilédones de soja de acordo com o item 3.5. Também foram realizados nos ensaios de competição controles com água destilada estéril, com OGAs puros e co-aplicados com o β glucano de *P. sojae*. O pH das amostras foi medido antes da aplicação nos cotilédones.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de parâmetros de crescimento, esporulação e atividade indutora para *M. ramosissimus* crescido em SMA

O fungo *M. ramosissimus* foi cultivado em um meio de cultura mínimo (SMA) que, além de promover maior esporulação do fungo, evita possíveis interferências (ocasionadas por amido) na caracterização química do eliciador contido em seus esporos, que ocorrem quando se utiliza cepa crescida em meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) (M.R. Braga, comunicação pessoal).

Preliminarmente ao estabelecimento dos parâmetros de crescimento, uma solução de esporos vivos do fungo cultivado em SMA (na concentração de 10^9 esporos/mL) foi testada em cotilédones de soja para averiguar se a capacidade indutora de fitoalexinas destes foi mantida após a troca das condições nutrientes para o fungo. Os esporos do fungo cultivado em SMA por 12 dias induziram a produção de grandes quantidades de daidzeína, o precursor imediato das gliceolinas (Figura 6). Genisteína e gliceolinas foram produzidas em menor quantidade, sendo a quantidade de gliceolinas inferior àquela presente no controle com água destilada estéril. A baixa conversão de gliceolinas pode ter ocorrido pelo fato do ensaio ter sido realizado durante o inverno, uma vez que as condições ambientais, como luz e temperatura afetam o acúmulo de gliceolinas pelos tecidos de soja (Graham, 1995). Além disso, ensaios posteriores que serão descritos a seguir demonstraram que esse período de cultivo (12 dias) não é o mais indicado para a obtenção de moléculas mais ativas na indução de gliceolinas em soja. Mesmo assim, os esporos do fungo crescido em SMA mostraram um potente efeito indutor de metabólitos de defesa em cotilédones de soja, conforme anteriormente relatado por Cordeiro Neto & Dietrich (1992).

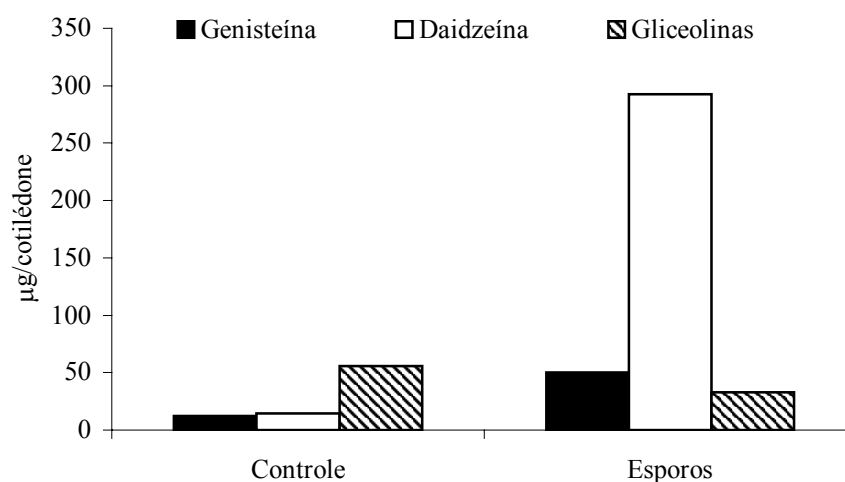


Figura 6. Atividade de esporos do fungo *M. ramosissimus* na indução de fitoalexinas em cotilédones de soja. Cinquenta μL de uma suspensão contendo cerca de 10^9 esporos / mL, extraídos do fungo cultivado por 12 dias em meio de cultura mínimo (SMA), foram aplicados sobre a superfície cortada de cada cotilédone. Após 20 horas de eliciação, a atividade indutora do fungo foi avaliada através dos conteúdos de genisteína, daidzeína e gliceolinas, produzidas pelos cotilédones e quantificadas por HPLC.

Os parâmetros de crescimento, esporulação e atividade indutora do fungo *M. ramosissimus* já haviam sido descritos por Cordeiro Neto (1992) para culturas crescidas em BDA. Como o meio nutriente é um fator importante que influencia comportamento de fungos, estes parâmetros foram novamente estabelecidos para o fungo crescido em SMA.

O fungo *M. ramosissimus* cultivado em SMA apresentou crescimento típico de espécies do seu gênero, as quais crescem entre 25-30°C e rapidamente cobrem a superfície do meio nutriente com seu micélio, que apresenta uma aparência semelhante a um algodão, atingindo alguns centímetros de altura (Figura 4A) (Ellis, 1997). O crescimento radial deste fungo em SMA (Figura 7) foi mais lento quando comparado ao crescimento em BDA (Cordeiro Neto, 1992). No meio SMA, as culturas atingiram o diâmetro das placas de Petri (9 cm) em torno do 6º dia de cultivo, o que para o meio BDA ocorreu no 4º dia da cultura. A curva de crescimento radial apresentou ausência de uma fase de adaptação ("lag"), sendo caracterizada por um rápido crescimento exponencial até o 4º dia de cultivo (Figura 7).

A esporulação do fungo *M. ramosissimus*, cultivado em SMA (Figura 8 A), foi cerca de 10 vezes maior do que a do mesmo fungo crescido em BDA (Cordeiro Neto, 1992), o que era esperado para esta espécie quando foi transferida para o meio mínimo. A produção de esporos ocorreu já nos estádios iniciais de crescimento das culturas e foi maior entre o 9º e o 13º dia de cultivo do fungo (Figura 8 A). Após o 13º dia houve redução da quantidade de esporos, o que também foi visto por Cordeiro Neto (1992), o qual associou esta redução a um efeito de auto-inibição, que é atribuído à ação de substâncias inibidoras de esporulação liberadas pelos esporos e acumuladas no meio de cultura. A redução na produção de esporos também pode ocorrer pela germinação daqueles produzidos anteriormente.

O rendimento de carboidratos dos extratos eliciadores obtidos em cada fase de esporulação (Figura 8 A) foi proporcional à quantidade de esporos obtidos somente a partir do 7º

dia de cultivo. Devido a baixa quantidade de açúcar na fase inicial de esporulação, apenas os eliciadores concentrados obtidos a partir do 6º dia de idade das culturas foram submetidos a testes de eliciação em cotilédones de soja.

A absorbância dos difusatos dos cotilédones de soja (Figura 8 B) indicou a presença de atividade indutora em todos os tratamentos com o eliciador, os quais diferiram do controle (com água destilada estéril), sendo observada maior eliciação nas incubações com o eliciador derivado de esporos do fungo com 8 e 9 dias de cultivo.

A análise dos extratos dos difusatos por HPLC indicou a presença de grandes quantidades do precursor daidzeína em todos os tratamentos (Figuras 9 e 10), porém com maior conversão concomitante em gliceolinas nos extratos referentes ao eliciador com 9 dias de cultivo (Figuras 9 C e 10). Pouca produção de genisteína foi observada nos tratamentos, indicando que o eliciador de *M. ramosissimus* não é eficaz na indução de seu acúmulo em cotilédones de soja.. Embora este metabólito não seja precursor de gliceolinas, alguns estudos têm relatado sua atividade tóxica contra fungos (Graham & Graham, 1989).

Em todos os tratamentos, o aumento na quantidade de gliceolinas foi acompanhado pela diminuição de daidzeína (Figura 10). A biossíntese de fitoalexinas em tecidos de soja é regulada tanto por enzimas iniciais da via dos fenilpropanóides, como a PAL, a chalcona-sintase e isomerase, como por enzimas que hidrolisam rapidamente conjugados glicosilados de daidzeína pré-existent, causando a liberação deste precursor, o qual em etapas finais da produção de fitoalexinas é o substrato para a ação de outras enzimas que o converte em gliceolinas (Graham *et al.*, 1990; Dixon & Paiva, 1995). Dessa forma, as culturas do fungo com 9 dias de idade parecem possuir em seus esporos moléculas indutoras mais ativas na indução das rotas metabólicas que levam à produção de gliceolinas.

Os dados de absorbância a 286 nm não mostraram diferenças significativas de leitura dos difusatos correspondentes aos tratamentos com eliciadores obtidos de esporos das culturas com 8 e 9 dias de idade (Figura 8 B), mas a quantidade de gliceolinas produzida nesses tratamentos foi bastante distinta (Figura 10). Os dados de absorbância a 286 nm referem-se ao conteúdo fenólico total dos difusatos, que é apenas um indicativo da síntese de compostos de defesa, mas não podem ser considerados proporcionais à quantidade de gliceolinas produzidas.

Cordeiro Neto (1992) estabeleceu uma faixa entre o sexto e o décimo dia de idade da cultura como a ideal, em termos de esporulação e atividade indutora de gliceolinas, para a obtenção do eliciador do fungo crescido em BDA. Com os estudos referentes ao crescimento, esporulação e atividade indutora de *M. ramosissimus* crescido em SMA foi determinado o 9º dia de cultivo como a melhor fase para obtenção do eliciador por autoclavagem dos esporos, com a vantagem de eliminar contaminantes presentes no meio BDA e que podem interferir na atividade eliciadora.

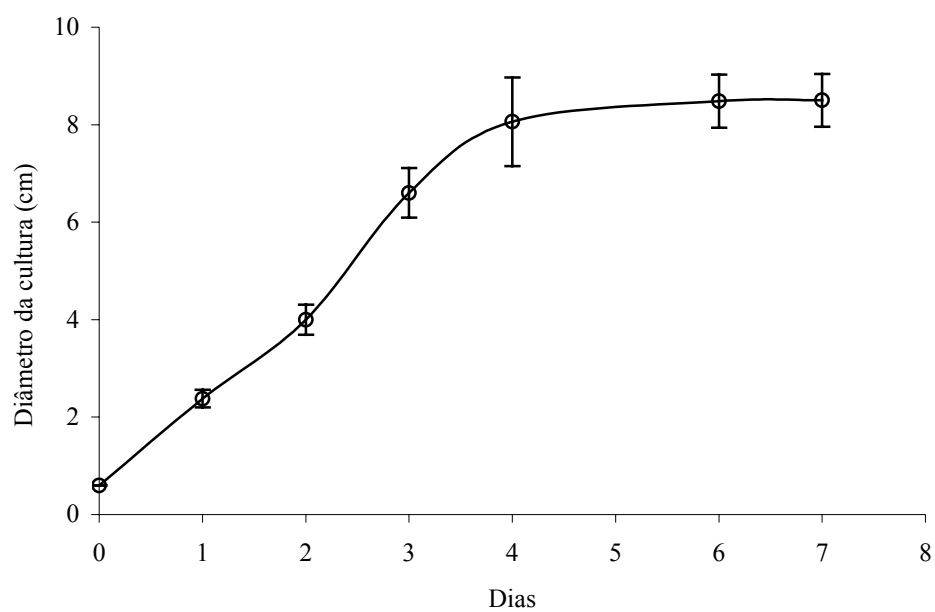


Figura 7. Curva de crescimento radial do micélio do fungo *M. ramosissimus* cultivado em meio SMA. As barras representam o desvio padrão da média de três repetições.

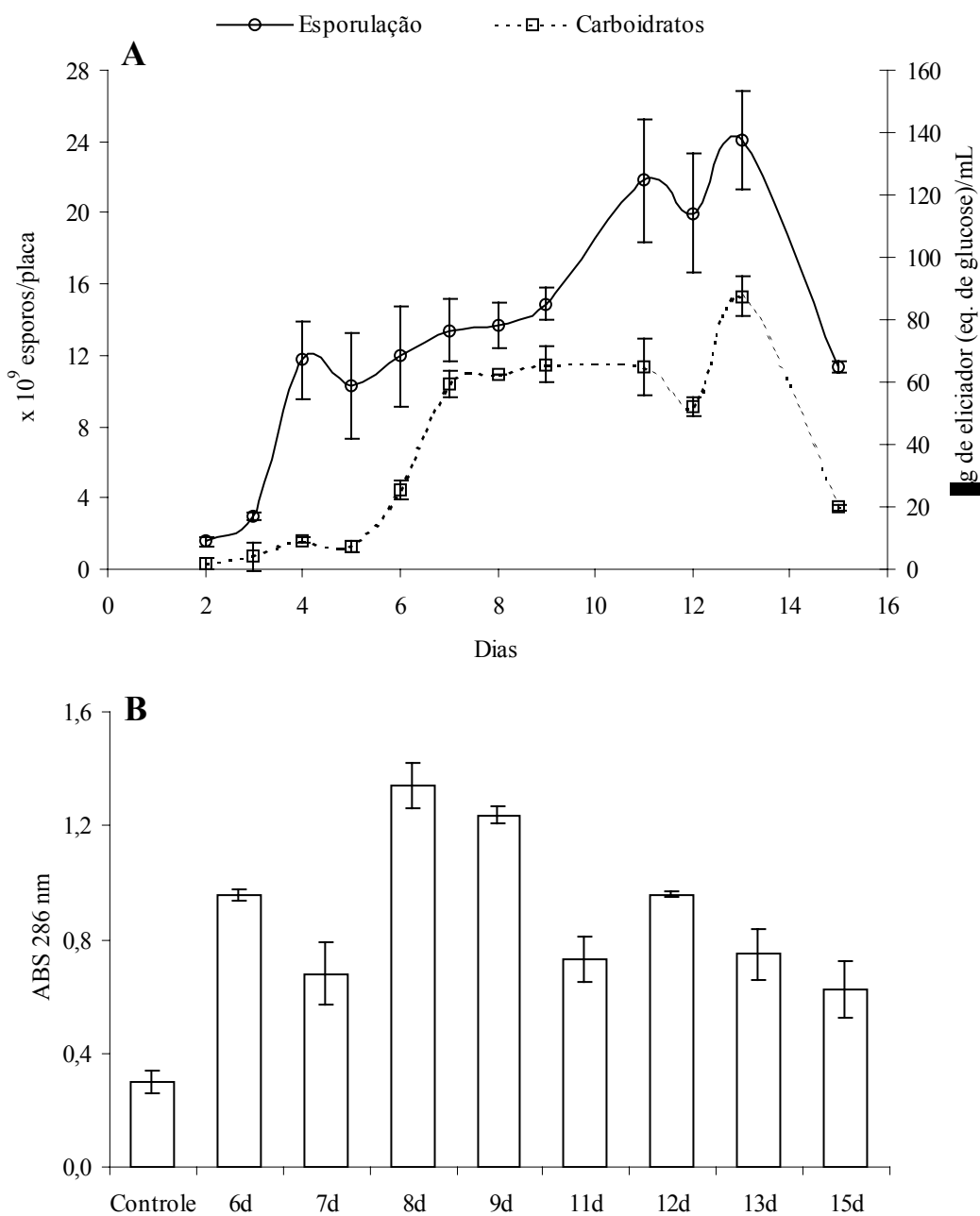


Figura 8. (A) Curva de esporulação de *M. ramosissimus* cultivado em SMA (Synthetic-*Mucor*-Agar) e quantidade de carboidratos presente no eliciador em função da idade da cultura. (B) Atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja do eliciador concentrado obtido a partir de diferentes fases de esporulação do fungo, medida por absorbância dos difusatos a 286 nm. Em (A) as barras representam o desvio padrão da média três de repetições da contagem de esporos e, no caso dos carboidratos, da dosagem dos três extratos reunidos (1 mL de extrato = eliciador de esporos obtidos de 3 placas). Em (B) as barras referem-se ao desvio padrão das repetições do bioensaio em cotilédones de soja.

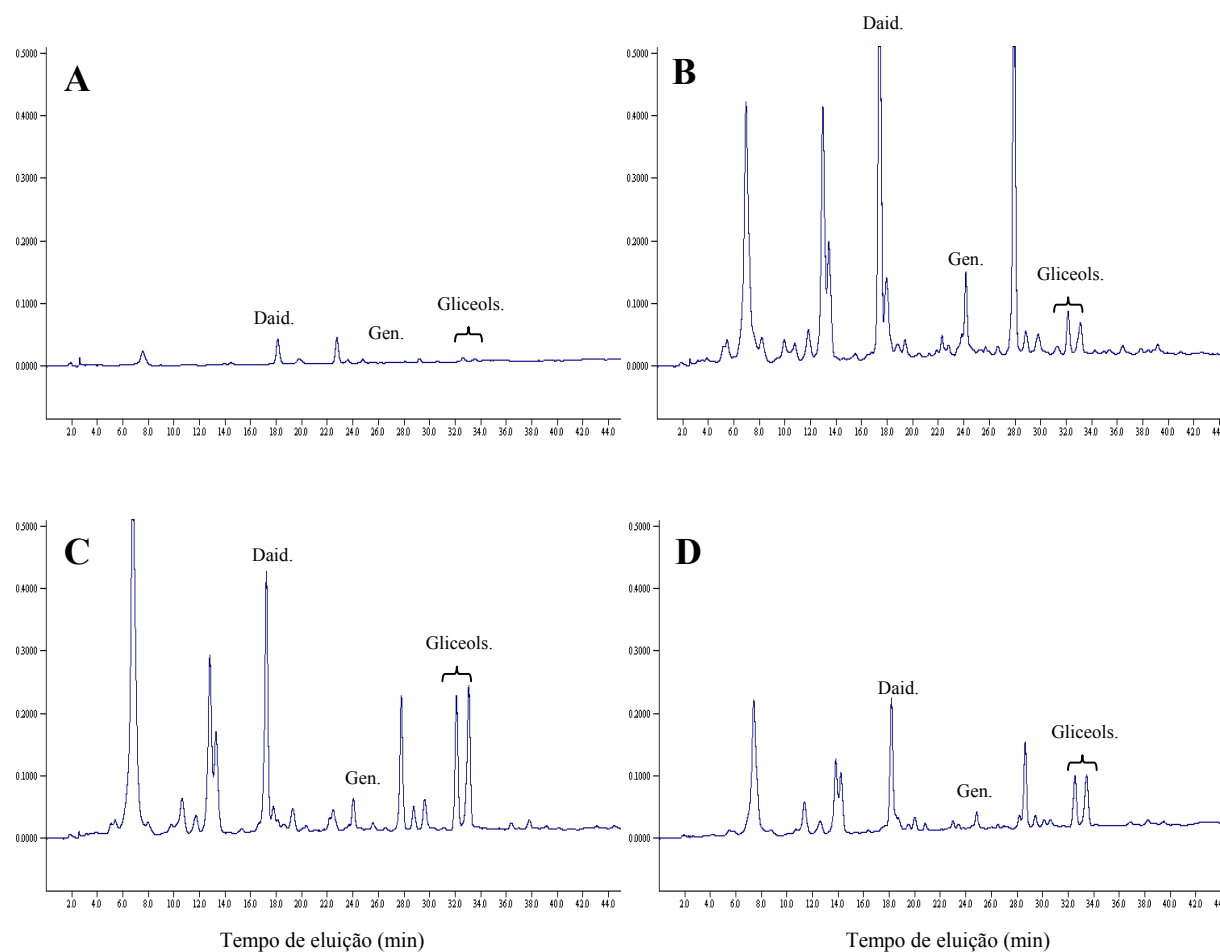


Figura 9. Perfil de eluição em HPLC de extratos de difusatos de cotilédones de soja tratados com água destilada estéril (A), com eliciador extraído de esporos do fungo de *M. ramosissimus* com 8 dias (B), 9 dias (C) e 11 dias de cultivo (D). Daid. = daidzeína, Gen. = genisteína, Glíceols. = gliceolinas. Os demais picos não foram identificados.

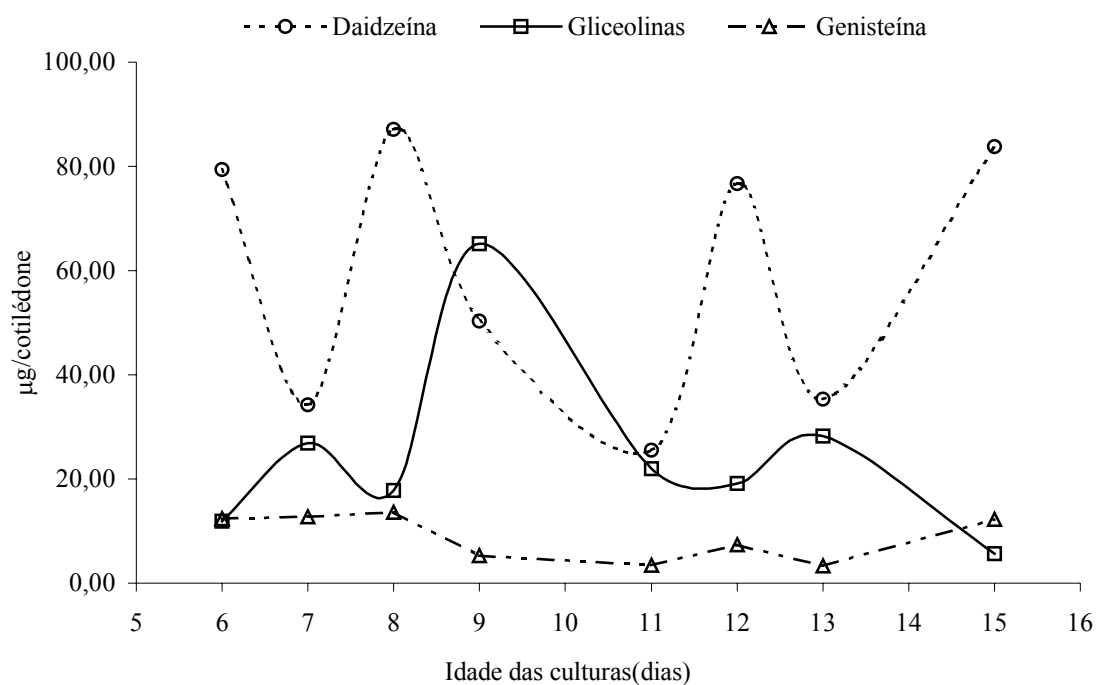


Figura 10. Atividade indutora dos eliciadores concentrados obtidos a partir de diferentes fases de esporulação de *M. ramosissimus* avaliada pela produção de genisteína, daidzeína e gliceolinas quantificadas por HPLC.

4.2 Purificação e caracterização do eliciador de *M. ramosissimus*

Os estudos de purificação e caracterização química de eliciadores derivados de fungos têm facilitado a compreensão das interações que ocorrem entre plantas e microrganismos, uma vez que permitem analisar, de maneira isolada, o reconhecimento e o efeito de moléculas sinalizadoras na indução de mecanismos de defesa nos tecidos vegetais (Montesano *et al.*, 2003). Dois processos de purificação do eliciador de *M. ramosissimus* foram realizados com a mesma metodologia, sendo que neste trabalho são apresentados os resultados referentes ao segundo processo, que foi mais eficiente na obtenção do eliciador com menor teor de contaminantes inativos.

Trezentas culturas do fungo com 9 dias de idade foram utilizadas para obtenção da suspensão de esporos. Após etapa de autoclavagem dos esporos e centrifugação, o rendimento do sobrenadante foi de 469,8 mg equivalentes de glucose. A concentração e precipitação etanólica realizadas em sequência resultaram na perda de 92 % dos carboidratos totais presentes inicialmente na fração sobrenadante do autoclavado de esporos. Conforme demonstrado por Cordeiro Neto (1992), moléculas eliciadoras obtidas de esporos também podem ser encontradas no sobrenadante resultante da precipitação etanólica. Entretanto, essa atividade é pequena e a quantidade de moléculas indutoras não justifica sua utilização em um processo de purificação. Dosagens de proteínas foram realizadas no eliciador concentrado obtido após precipitação com etanol, sendo quantificadas 4,5 mg de proteínas, quantidade que foi cerca de oito vezes inferior àquela de carboidratos encontrada nesta fração, indicando menor participação destas moléculas na composição do eliciador.

As análises de composição em monossacarídeos neutros dessas frações feitas por HPAEC/PAD (Figura 11) mostraram que o sobrenadante dos esporos autoclavados apresentava

96 % de glucose. Esse teor foi reduzido a 41 % após precipitação etanólica, sendo o eliciador concentrado composto em maior proporção por manose (55%), seguida de glucose (41,5%) e apresentando também traços de arabinose e galactose (Figura 11).

Tanto o sobrenadante do autoclavado de esporos quanto o eliciador concentrado apresentaram atividade indutora da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja (Figura 12). De acordo com a indução de compostos fenólicos totais, avaliada pelos dados de absorbância a 286 nm (Figura 12 A), não foram observadas diferenças significativas na atividade dos extratos ensaiados. Entretanto, a análise dos difusatos por HPLC revelou que após a etapa de precipitação etanólica, ocorreu um aumento significativo da atividade indutora de gliceolinas (Figura 12 B). A fração precipitada com etanol (eliciador concentrado) apresentou atividade quatro vezes maior que o sobrenadante do autoclavado de esporos, o que indica eficiência dessa etapa na purificação de moléculas ativas. Além disso, maior conversão de gliceolinas ocorreu em resposta a atividade do eliciador concentrado em comparação a produzida pelo β -glucano isolado de *P. sojae*, que foi utilizado como controle positivo do ensaio em cotilédones de soja (Figura 12 B). Embora esse β -glucano tenha sido utilizado em concentrações nanomolares e o eliciador de *M. ramosissimus* em micromolares, a atividade indutora da síntese de gliceolinas para este último foi alta, considerando-se que a fração usada ainda era bastante impura.

A Figura 13 mostra o efeito da dose do eliciador de *M. ramosissimus* sobre a indução da produção de fitoalexinas em cotilédones de soja. O aumento da concentração do eliciador foi acompanhado por aumento na indução de gliceolinas e do precursor daidzeína (em menor quantidade), indicando uma resposta dose-dependente. A produção de genisteína não foi considerável, assim como foi observado na maioria dos outros ensaios realizados. Esta curva de atividade indutora estabelecida para o eliciador precipitado de *M. ramosissimus* foi extremamente

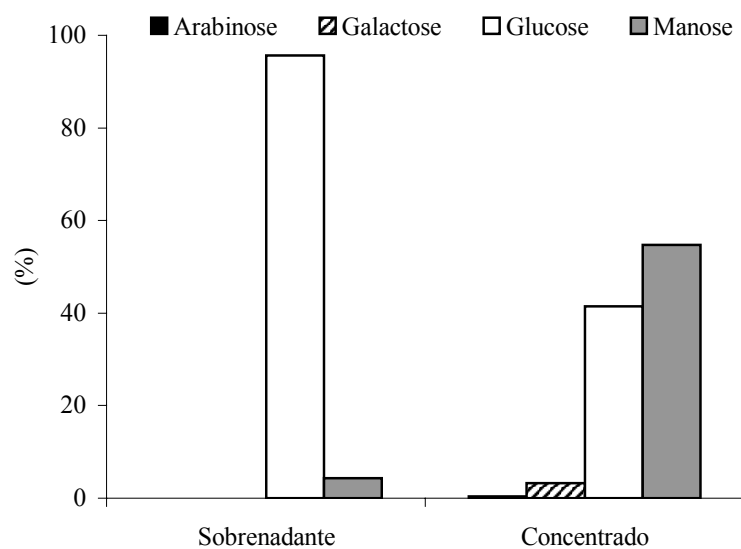


Figura 11. Proporção relativa (%) de monossacarídeos neutros obtida por análises de HPAEC/PAD nas frações obtidas pelos processos iniciais de purificação do eliciador de *M. ramosissimus*. Sobrenadante = fração sobrenadante da suspensão de esporos autoclavada. Concentrado = fração resultante de precipitação etanólica.

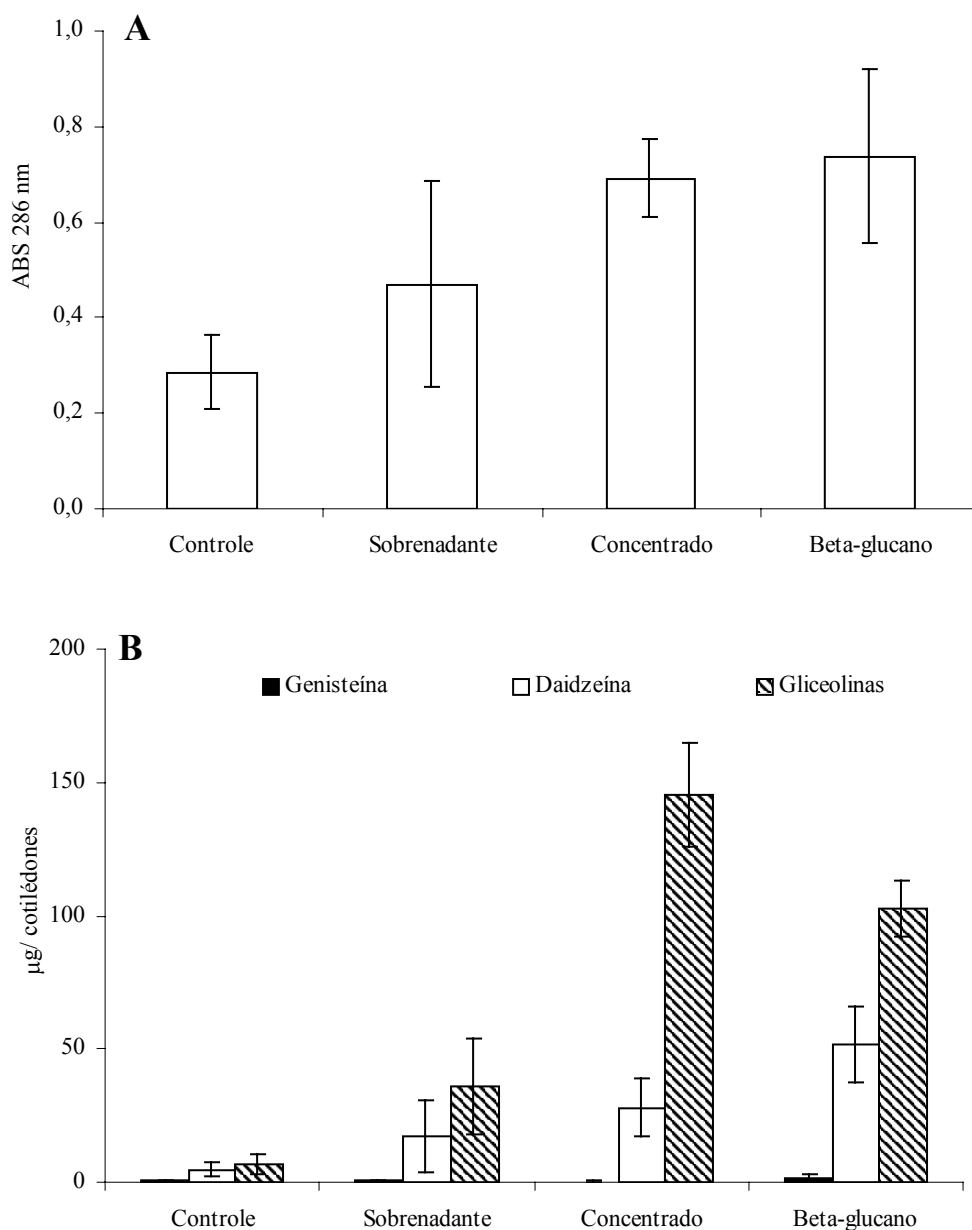


Figura 12. Atividade indutora de fitoalexinas das frações do eliciador de *M. ramosissimus* obtidas por centrifugação de esporos autoclavados = sobrenadante; precipitação etanólica = concentrado. Controle = água destilada, beta-glucano = β -glucano isolado de *P. sojae*. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas. (A) Leitura dos difusatos a 286 nm e (B) quantificação de genisteína, daidzeína e gliceolinas por HPLC.

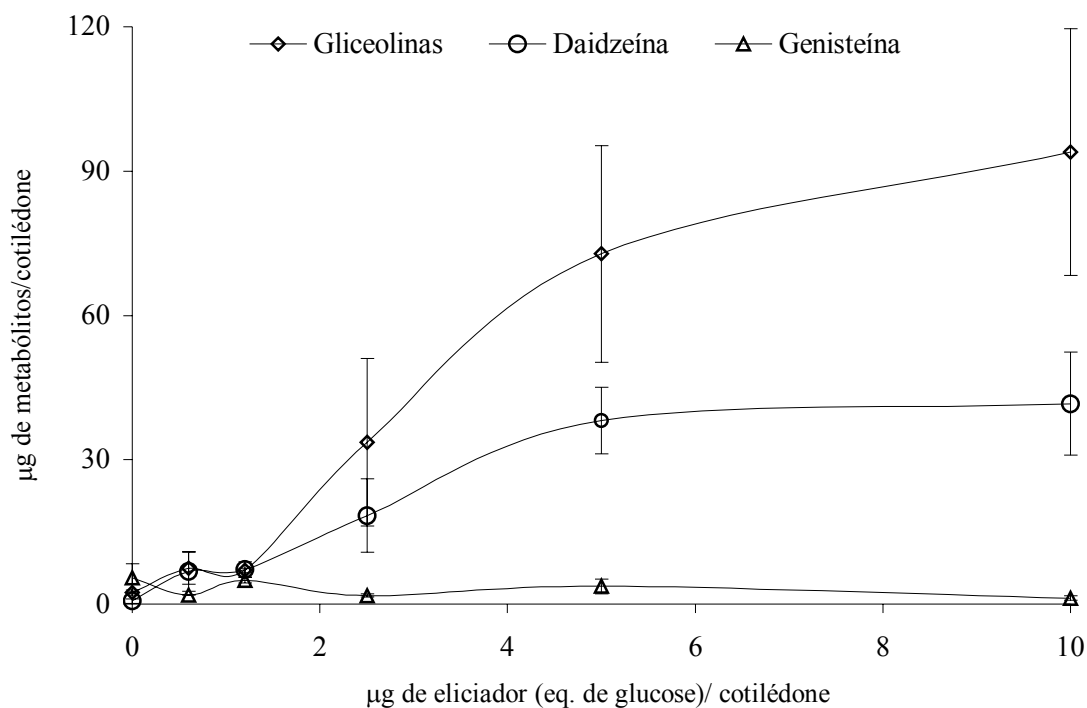


Figura 13. Curva dose-resposta do eliciador de *M. ramosissimus* (eliciador concentrado). Atividade indutora avaliada por quantificação de daidzeína, genisteína e glicéolinas em HPLC. A produção média de glicéolinas induzidas pelo controle positivo realizado neste ensaio (tratamento com 0,1 μg/ cotilédono do β-glucano de *P. sojae*) foi de 56 μg/ cotilédono.

similar à estabelecida por Hahn & Albersheim (1978) para uma fração bruta obtida por precipitação etanólica do eliciador de leveduras, que se trata de um β -glucano com características similares aquele isolado do fungo *P. sojae*.

A quantidade de metabólitos produzidos pelo efeito das diferentes concentrações do eliciador concentrado de *M. ramosissimus* obtido por precipitação etanólica foi baixa (Figura 13), quando comparada a quantidade produzida pela concentração de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (2,5 $\mu\text{g}/\text{cotilédone}$) desta mesma fração do eliciador utilizada em ensaios anteriores (Figura 12). Entretanto, deve ser considerado que o acúmulo de gliceolinas pelo tratamento dos cotilédones com o β -glucano de *P. sojae* (utilizado como controle positivo da resposta de defesa na concentração de 0,1 $\mu\text{g} / \text{cotilédone}$) também foi pequeno, com valores ao redor de 56 μg de gliceolinas/ cotilédone (Figura 13). A produção de fitoalexinas em cotilédones de soja é bastante sensível a variações nas condições ambientais, sendo também influenciada pela idade e estágio de desenvolvimento do órgão infectado ou tratado com eliciadores. Além disso, alguns estudos têm mostrado que a síntese de fitoalexinas nas células de soja está relacionada a uma pré-ativação da competência de eliciação que está associada à injúria e a resposta de hipersensibilidade, na qual células mortas são responsáveis pela liberação de fatores de competência que sinalizam e condicionam células vivas vizinhas a responderem com a síntese de metabólitos (Abbasi *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Graham & Graham, 1996). Dessa forma, o estado de competência dos cotilédones utilizados para determinação do efeito da dose do eliciador de *M. ramosissimus* poderia estar reduzido, o que explicaria a redução no nível dos metabólitos produzidos.

O eliciador de *M. ramosissimus* mostrou-se altamente estável a altas temperaturas, uma vez que foi capaz de induzir a síntese de gliceolinas em soja, após o processo de autoclavagem. A estabilidade térmica é uma característica comum a diversos eliciadores, principalmente a

fragmentos originados de carboidratos estruturais de fungos, como é o caso do β -glucano presente na parede celular de micélio do fungo *P. sojae* caracterizado por Ayers *et al.* (1976a) e aquele derivado do fungo *Colletotrichum lindermuthianum* composto por unidades glucosil 3 e 4-ligadas (Anderson-Prouty & Albersheim, 1975).

O eliciador concentrado contendo 6,52 mg equivalentes de glucose foi aplicado em coluna de troca aniônica Hi Trap Q Sepharose e as frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico de carboidratos e a força iônica, sendo obtidas 7 frações denominadas de 10 mM, G1, G2, G3, G4, G5 e 1M (Figura 14). Altos teores de carboidratos foram detectados nas frações 10 mM e 1M através de ensaio colorimétrico a 490 nm, e de proteínas (absorbância 280 nm) apenas na fração 1M (Figura 14). A composição de monossacarídeos neutros dessas frações foi similar, sendo estas constituídas por altos teores de manose, seguida de unidades de glucose, galactose e arabinose (Figura 15). Foi observada redução na proporção relativa de manose nas frações que mais interagiram com a matriz da coluna Hi Trap Q Sepharose (G4, G5 e 1M), com concomitante incremento na proporção de glucose e galactose.

A atividade indutora de fitoalexinas em cotilédones de soja das frações separadas pela coluna de troca iônica foi avaliada pelo conteúdo fenólico total (absorbância dos difusatos a 286 nm) e análise da produção de metabólitos por HPLC (Figura 16). As frações que induziram maior acúmulo de gliceolinas foram a G2, G3, G4 e 1 M, as quais ficaram ligadas à matriz da coluna de troca iônica e foram eluídas em gradiente ou isocraticamente (1M) com tampão bicarbonato de amônio (Figura 16 B). A atividade específica das frações G3, G4 e 1M foi de 65,8, 52,72 e 68,52 μg de gliceolinas/ μg equivalentes de açúcar do eliciador aplicado nos cotilédones de soja, respectivamente. A fração 1M apresentou maior atividade específica, sendo esta cerca de 20 % superior à aquela obtida para o eliciador concentrado (Tabela 1). As demais frações ligadas à

coluna, referentes ao gradiente (G1, G2 e G5) com bicarbonato de amônio, também apresentaram atividade indutora, porém esta foi reduzida. A dispersão de atividade ao longo do gradiente iônico pode estar relacionada à presença na amostra eluída de fragmentos de moléculas ativas com cargas e tamanhos distintos. Nothnagel *et al.* (1983) separaram, em coluna de troca aniônica (QAE Sephadex), oligogalacturonídeos com diferentes graus de polimerização, sendo que os fragmentos com maior quantidade de unidades de ácido galacturônico tiveram maior interação com a matriz da coluna. Além disso, estudos com oligoglucosídeos β -ligados demonstraram a presença de estruturas mínimas em moléculas eliciadoras de diferentes tamanhos. Essas moléculas são reconhecidas pelos receptores de membrana de soja desencadeando a síntese de fitoalexinas, sendo o fragmento mais ativo um hepta- β -glucosídeo (Cheong *et al.*, 1991).

Hahn & Albersheim (1978) ao isolarem o β -glucano de leveduras, também um eliciador inespecífico da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja, mostraram que as frações mais ativas contendo este eliciador não se ligaram as colunas de troca iônica DEAE-Cellulose e Sulfopropyl-Sephadex. O eliciador de *M. ramosissimus* apresentou interação com a coluna de troca iônica utilizada o que demonstra que sua estrutura química deve ser diferente do β -glucano obtido de paredes celulares de *S. cerevisiae*.

A interação das moléculas eliciadoras com trocador aniônico da coluna juntamente com a detecção de compostos a 280 nm nas frações mais ativas (G3, G4 e 1M, Figura 14) indicaram que não apenas açúcares neutros compõem a estrutura química do eliciador de *M. ramosissimus*. Assim sendo, o eliciador de *M. ramosissimus* poderia conter seqüências peptídicas e ou açúcares ácidos em sua molécula. Campos-Takaki (1984) relatou a presença de ácidos urônicos nas paredes celulares de 7 espécies de *Mucor*.

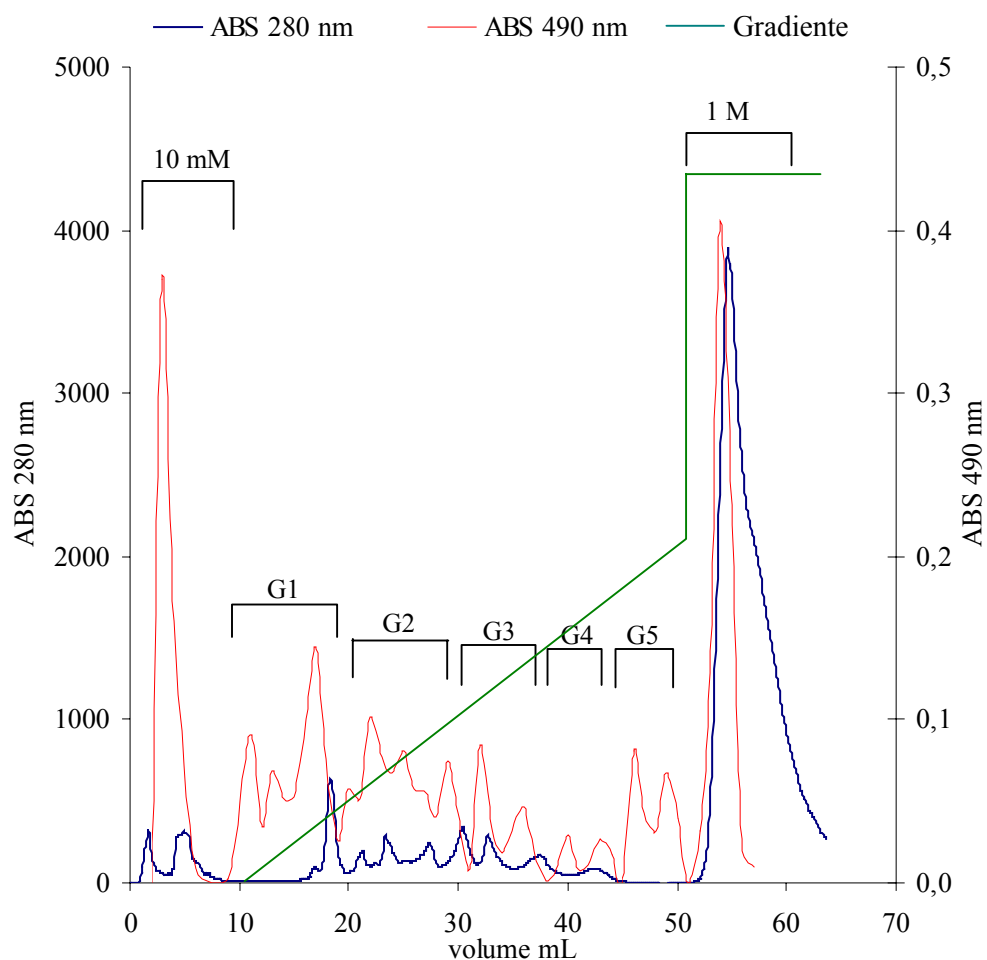


Figura 14. Perfil de eluição do eliciador de *M. ramosissimus* em coluna Hi Trap Q Sepharose. As frações obtidas foram reunidas conforme mostrado na figura. Fração 10 mM = fração eluída com 10 mM de bicarbonato de amônio (não retida na coluna), G1-G5 = frações resultantes do gradiente com bicarbonato de amônio (10-500 mM) que foram retidas na coluna; e 1M = fração eluída com 1 M do mesmo tampão (retida na coluna). A absorbância das frações a 280 nm estima a presença de proteínas e a absorbância a 490 nm representa os valores obtidos após ensaio colorimétrico para a detecção de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico.

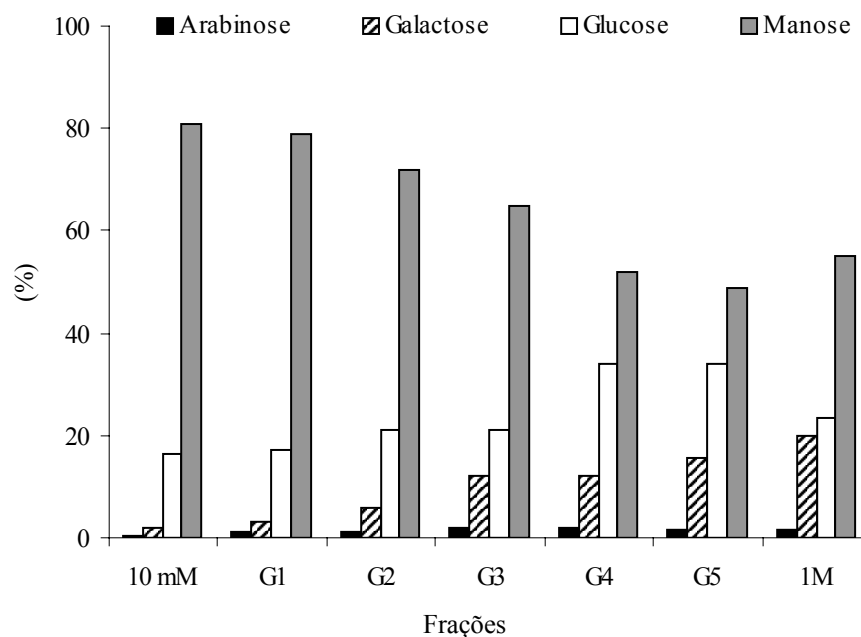


Figura 15. Proporção relativa (%) de monossacarídeos neutros obtida por análises de HPAEC/PAD das frações obtidas por eluição do eliciador de *M. ramosissimus* por cromatografia de troca iônica em coluna Hi Trap Q Sepharose em sistema de FPLC. Fração 10 mM= não retida na coluna; G1-G5 = frações resultantes do gradiente de 10-500 mM de tampão bicarbonato de amônio (retidas na coluna); 1 M = fração eluída com 1M do mesmo tampão (retida na coluna).

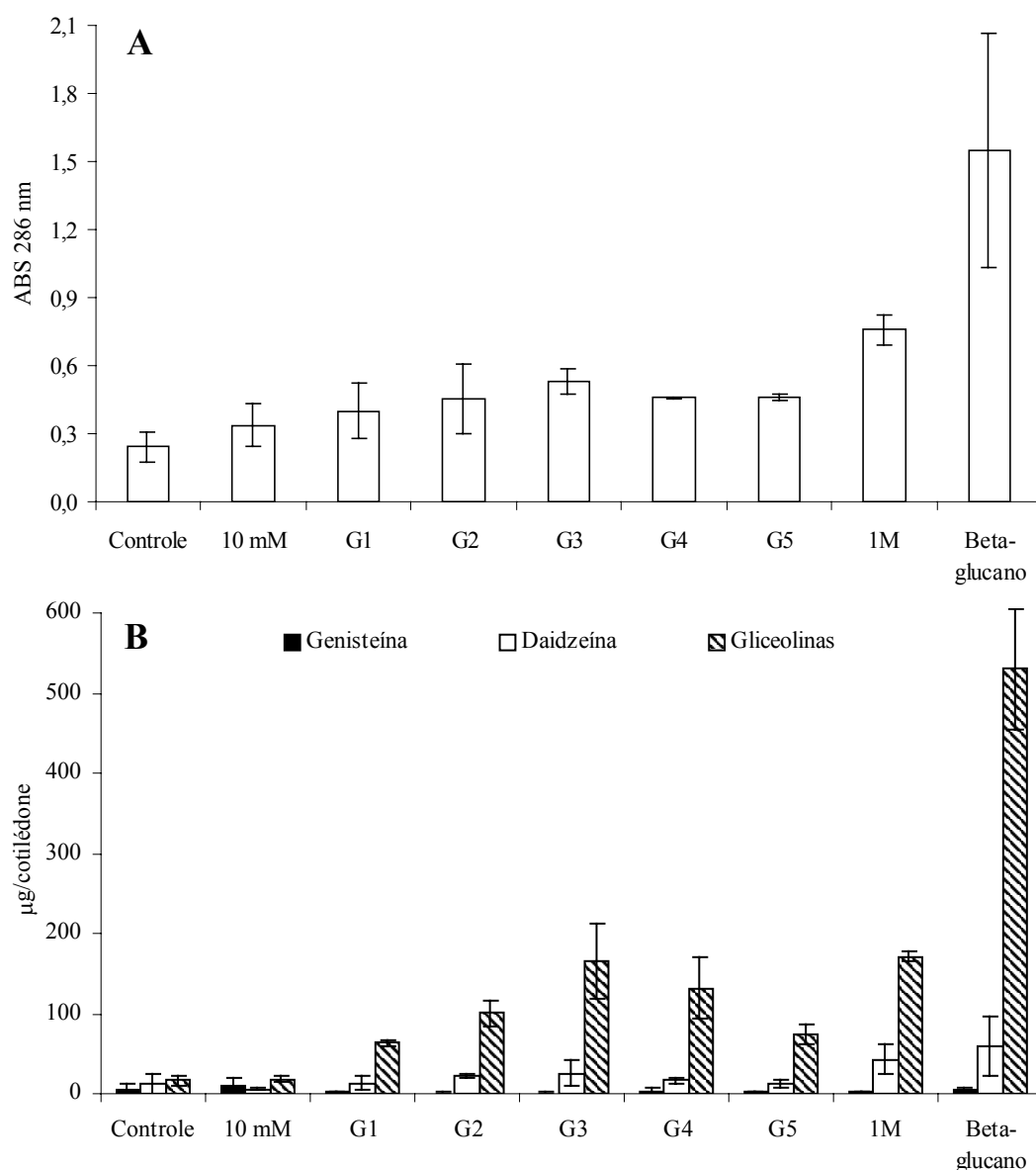


Figura 16. Medida de atividade indutora de fitoalexinas das frações do eliciador de *M. ramosissimus* obtidas por fracionamento em coluna de troca iônica Hi Trap Q Sepharose. (A) Leitura dos difusatos a 286 nm, (B) Produção de genisteína, daidzeína e gliceolinas analisadas por HPLC. Controle = tratamento com água destilada estéril; Beta-glucano = tratamento com o β -glucano de *P. sojae*; 10 mM = não retida, G1-G5 = retidas na coluna e referentes a eluição de 10-500 mm de tampão bicarbonato de amônio; 1 M = retida na coluna e eluída com 1 M do mesmo tampão. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas.

Para investigar se a atividade indutora do eliciador de *M. ramosissimus* estaria relacionada à presença de carboidratos ou de possíveis peptídeos associados à sua molécula, frações resultantes do gradiente iônico da coluna Hi Trap Q Sepharose (G1-G5) foram reunidas e tratadas com periodato de sódio e protease. Optou-se pelo uso dessas frações que também possuíram atividade indutora, para reservar aquela que apresentou maior atividade específica (1M), para as etapas posteriores de purificação do eliciador. O tratamento com periodato de sódio e protease mostrou que a atividade indutora do eliciador de *M. ramosissimus* está estritamente relacionada à porção glicídica da molécula (Figura 17). O tratamento com periodato de sódio reduziu totalmente a capacidade indutora deste eliciador, enquanto que a protease não afetou a capacidade de elicitar a síntese de gliceolinas em cotilédones de soja.

Diversos trabalhos têm descrito eliciadores que contêm oligopeptídeos associados a carboidratos. Schaffrath *et al.* (1995) purificaram um eliciador de micélio de *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*), fungo causador de doenças em arroz, que se trata de uma glicoproteína de 15,6 KDa, contendo sua porção glicídica composta por 59 % de manose, 27 % de galactose e 14 % de glucose. Os autores constataram que a atividade indutora desta molécula não estava relacionada à porção protéica, uma vez que não houve perda da atividade indutora após tratamentos deste eliciador com proteases, sendo esta abolida após degradação da porção glicídica com periodato de sódio.

A fração 1 M, ligada à matriz da Hi Trap Q Sepharose, e que apresentou alta atividade específica e maior rendimento em carboidratos, foi submetida à separação em coluna de afinidade Sepharose Con A (1,4 mg equivalentes de glucose) em eluição isocrática com tampão Tris pH 7,4, seguida de eluição com α -metil-manopiranosídeo. Carboidratos e compostos com absorção a

280 nm foram detectados nas duas frações resultantes, a não ligada a matriz do gel (NL Con-A) e naquela presa à matriz do gel (L Con-A) (Figura 18).

Apenas a fração sem afinidade pela matriz do gel (NL Con-A) apresentou atividade indutora em cotilédones de soja (Figura 19 A e B), o que supõe a presença de moléculas com ligação do tipo β na composição do eliciador de *M. ramosissimus*, uma vez que a lectina da matriz possui afinidade por unidades manosil e glucosil α -ligadas.

Quando a atividade desta fração (NL-Con-A) foi comparada àquela induzida pelo tratamento com o β -glucano de *P. sojae*, houve diferenças quanto à indução do conteúdo fenólico total, que se apresentou maior neste tratamento (Figura 19 A). No entanto, a produção de gliceolinas não diferiu entre ambos eliciadores e o precursor daidzeína foi produzido em maior proporção nos cotilédones em resposta ao β -glucano de *P. sojae*, o que explica os valores maiores de absorbância obtidos com este eliciador. Além disso, picos não identificados nos cromatogramas podem ser responsáveis por esta absorbância (Figura 20), os quais foram sempre encontrados em maior proporção no tratamento com o eliciador de *P. sojae*, sendo menos conspícuos na indução com o eliciador de *M. ramosissimus*. Embora não identificados, os picos que geralmente saem no início da eluição por métodos de análise de flavonóides em HPLC, possivelmente se referem a conjugados glicosilados, os quais possuem polaridade maior e ficam pouco tempo retidos na coluna de fase reversa (M. C. M. Young, comunicação pessoal). Durante a reação incompatível de resistência com *P. sojae*, os tecidos de soja respondem com a produção de fitoalexinas, sintetizadas a partir do precursor imediato (daidzeína) liberado por hidrólise de conjugados pré-existentes. Além disso, as isoflavonas daidzeína e genisteína passam a ser sintetizadas *de novo* e acumuladas nos tecidos como malonilglucosil-daidzeína e malonilglucosil-genisteína (Figura 3), possivelmente para evitar infecções subseqüentes (Graham, 1995). Se os

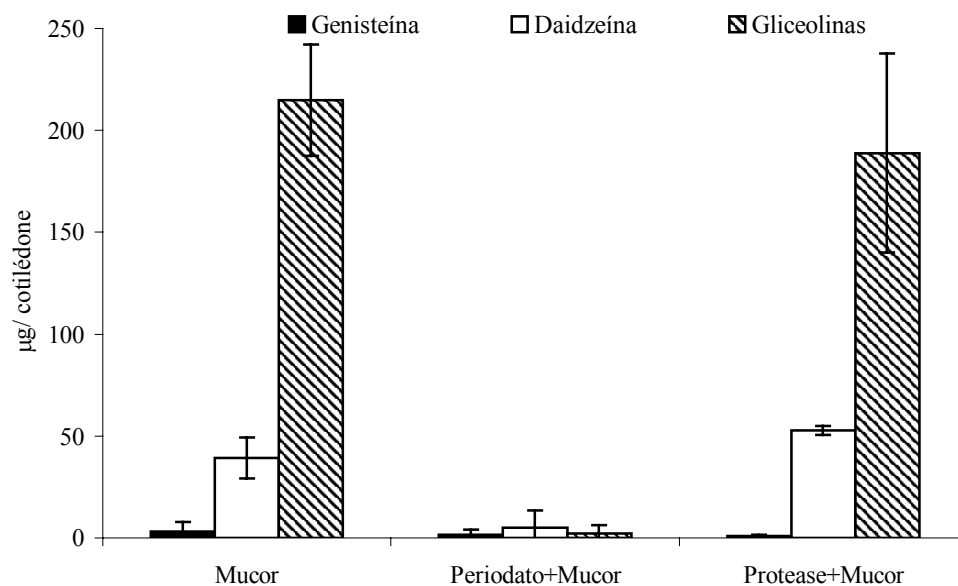


Figura 17. Atividade indutora de fitoalexinas do eliciador de *M. ramosissimus* (fração resultante do gradiente de eluição com tampão em coluna de troca iônica), avaliada por análise de difusatos de cotilédones de soja por HPLC. O eliciador foi previamente tratado com periodato de sódio (Periodato+*Mucor*) e com protease (Protease+*Mucor*). Foram descontados dos tratamentos os valores de controle negativo. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas.

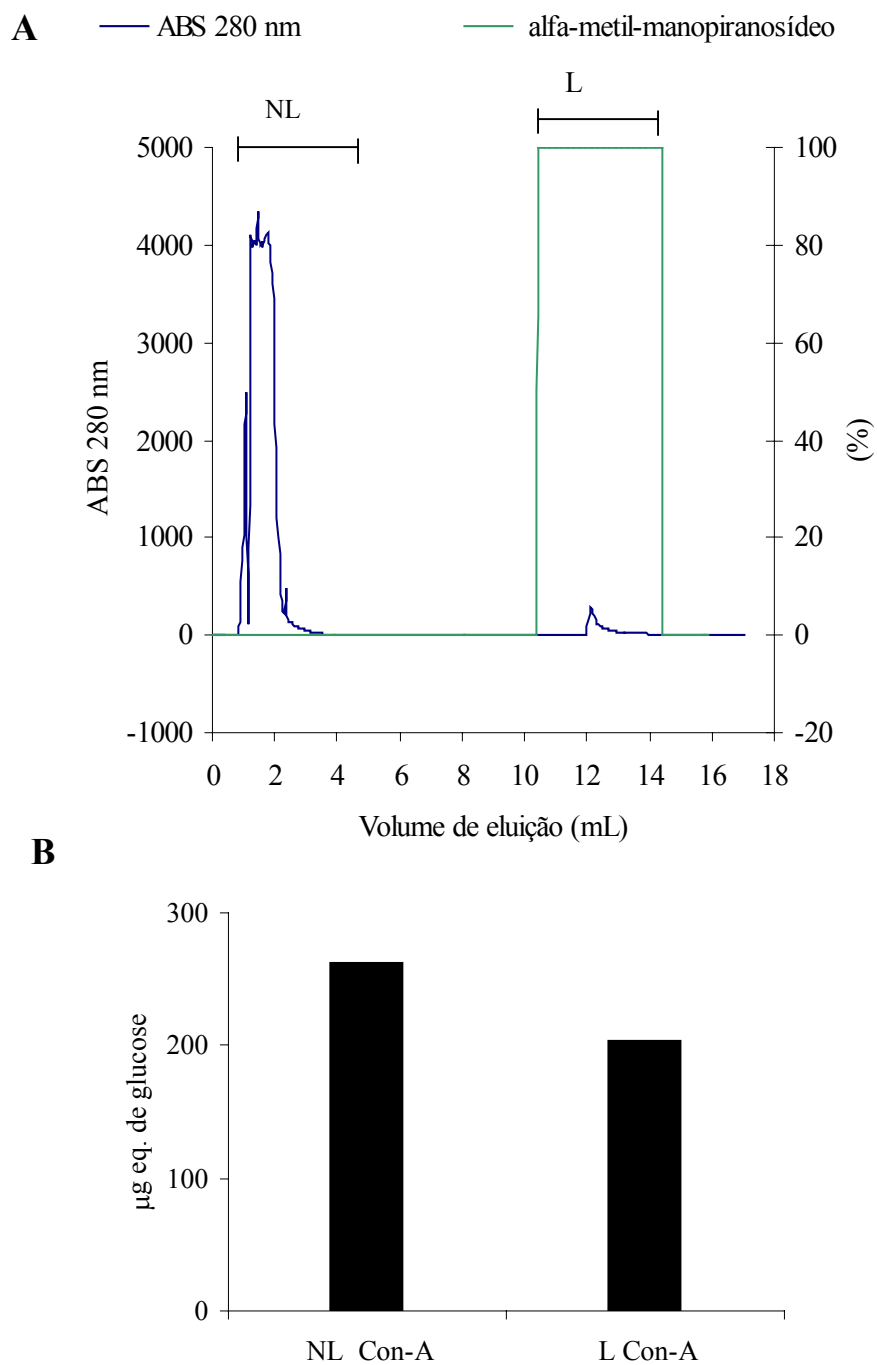


Figura 18. (A) Perfil de eluição do eliciador de *M. ramosissimus* em coluna de afinidade Sepharose Concanavalina A em sistema de FPLC e (B) teor de carboidratos quantificados por ensaio colorimétrico pelo fenol-sulfúrico das frações obtidas. NL= fração não ligada a matriz da coluna; L= fração ligada a matriz.

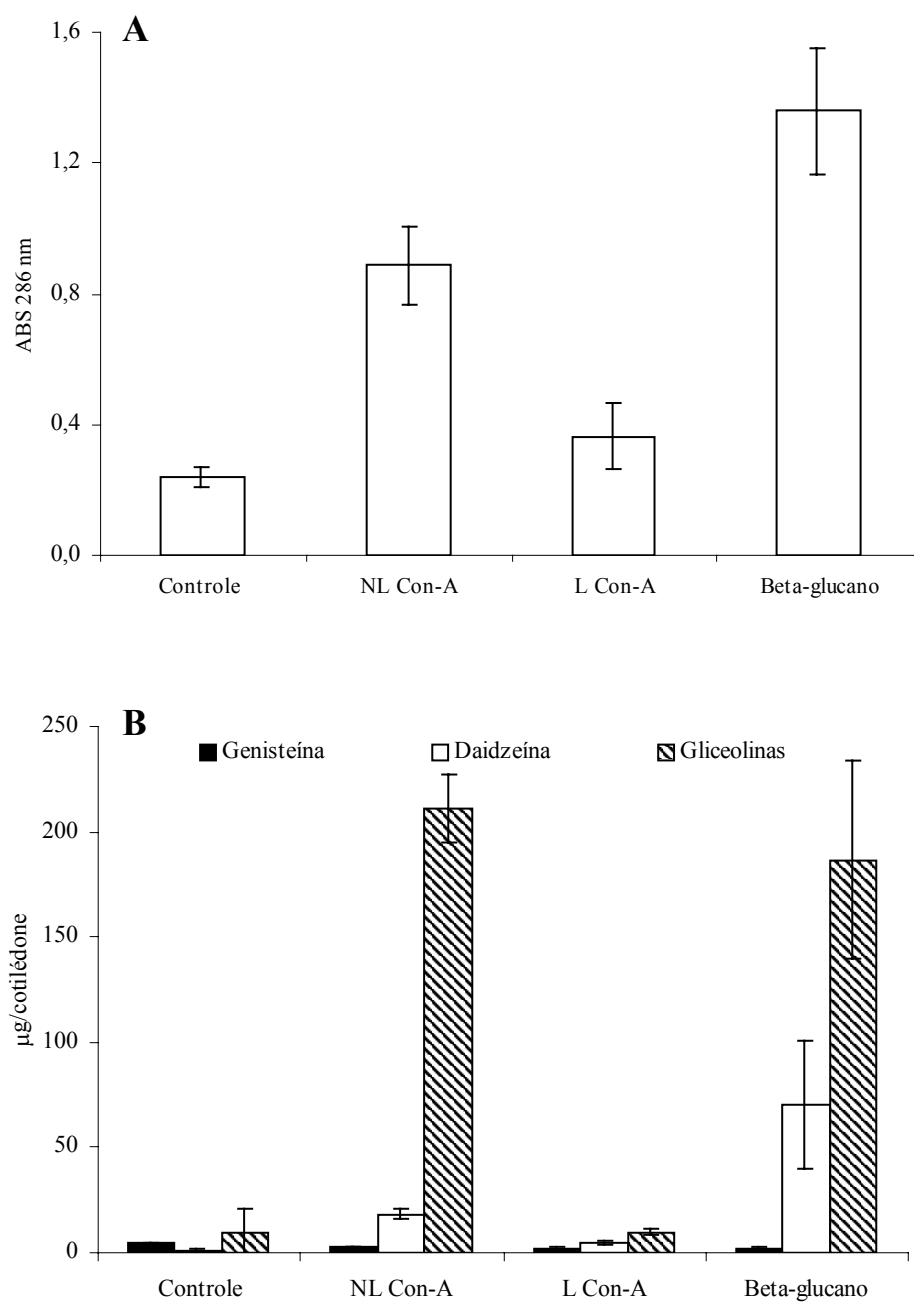


Figura 19. Medida de atividade indutora de fitoalexinas das frações obtidas por eluição do eliciador de *M. ramosissimus* em coluna Sepharose Concanavalina A. (A) Leitura dos difusatos a 286 nm, (B) Produção de genisteína, daidzeína e gliceolinas analisada por HPLC. Controle = tratamento com água destilada estéril; Beta-glucano = tratamento com o glucano de *P. sojae*; NL Con A = fração sem afinidade a matriz do gel; L Con A = fração ligada a matriz.

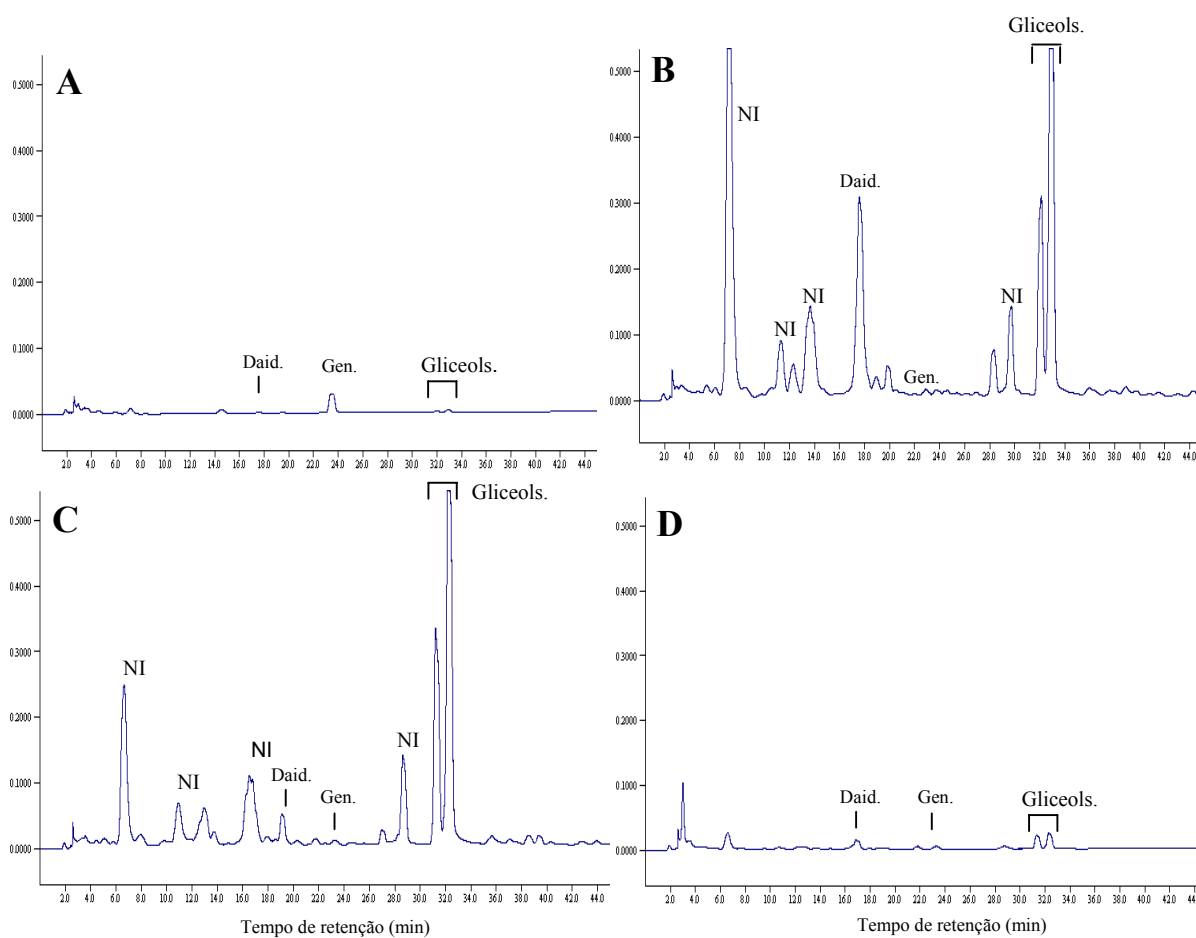


Figura 20. Perfil de eluição em HPLC de extratos de difusatos de soja tratados com frações do eliciador de *M. ramosissimus* obtidas por cromatografia de afinidade (Sephacrose Con-A). (A) Controle realizado com água destilada estéril; (B) tratamento com o β -glucano de *P. sojae*; (C) fração não ligada a matriz do gel e (D) fração ligada a matriz. Daid = daidzeína; Gen. = genisteína; e Glíceols = gliceolinas. NI = não identificado.

picos não identificados presentes nos cromatogramas realmente corresponderem a estes metabólitos glicosilados em sua forma malonil, o eliciador de *M. ramosissimus* parece não induzir a reposição e reserva destes glicoconjugados, indicando possíveis diferenças na resposta de defesa a este eliciador pelos tecidos de cotilédones de soja, quando comparado ao β -glucano de *P. sojae*.

Boué *et al.* (2000), ao inocularem quatro espécies de *Aspergillus* (*A. sojae*, *A. oryzae*, *A. niger* e *A. flavus*) em cotilédones de soja, verificaram que todas foram capazes de induzir a síntese de gliceolinas. Entretanto, *A. sojae* apresentou maior capacidade indutora, sendo inclusive superior àquela do patógeno *P. sojae*. *A. niger*, por sua vez, foi mais eficiente na indução da fitoalexina coumestrol nos cotilédones do que *A. sojae*, o que sugere que características estruturais e o reconhecimento das moléculas eliciadoras liberadas durante a infecção podem ocasionar diferenças nas proporções e tipos de metabólitos de defesa sintetizados, com conseqüências para resposta de resistência, que pode ser diferente dependendo do microrganismo indutor e da sensibilidade deles às substâncias produzidas.

A composição em monossacarídeos neutros das frações não ligada (NL) e ligada (L) a matriz da coluna de afinidade analisada por HPLC encontra-se na Figura 21. A fração retida ao gel e desprovida de atividade apresentou principalmente manose em sua composição. A fração ativa (NL Con-A) mostrou leve predominância de manose e proporções similares de glucose e galactose contendo pouca arabinose. O rendimento em carboidratos desta fração ativa foi de 262 μ g equivalentes de glucose e representou 0,05% do material inicialmente obtido (Tabela 1).

Quando esta fração foi submetida à análise de composição de açúcares por GC/MS através da preparação de derivados sililados (Tabela 2), foi possível observar que a mesma é composta predominantemente por ácido glucurônico, além de conter manose, ácido

galacturônico, galactose, glucose e traços de fucose. Arabinose foi detectada em pequena proporção na análise de açúcares neutros realizada por HPLC (Figura 21), mas não foi observada como componente dos derivados sililados analisados por GC/MS (Tabela 2). Isso se deve ao fato deste açúcar ser um componente minoritário da fração ativa, que é representada em sua maioria por açúcares ácidos. A presença de cargas negativas no eliciador atribuídas aos ácidos urônicos quando em meio alcalino poderia explicar sua ligação à coluna de troca aniônica Hi Trap Q Sepharose (Figura 14).

Na parede de esporangióforos do fungo *M. rouxii*, Bartnicki-Garcia & Reyes (1968) encontraram quatro polímeros distintos em sua composição, sendo eles: quitina; quitosano; ácido mucórico e mucorano. Este último trata-se de um heteropolímero composto de ácido glucurônico, fucose, manose, galactose e pequenas quantidades de glucose, conforme caracterização parcial, relatada por Bartnicki-Garcia & Lindberg (1972), de moléculas extraídas da parede de células leveduriformes de *M. rouxii*. Campos-Takaki (1984) também relatou a presença de tais monossacarídeos e de ácido galacturônico como componentes das paredes celulares de micélios de sete espécies de *Mucor*. A composição da fração NL Con-A de *M. ramosissimus* apresentou alguns dos monossacarídeos encontrados no mucorano, sugerindo que talvez as moléculas ativas possam ser fragmentos desse polissacarídeo. Nenhum relato sobre fragmentos de mucorano como moléculas eliciadoras foi encontrado em literatura.

Análises de ligação glicosídica realizadas preliminarmente com uma fração não ligada a Sepharose Con-A (NL Con-A) obtida em um processo anterior de purificação do eliciador de *M. ramosissimus* revelaram a presença de unidades de: manose terminal, manose 2-ligada, glucose 6-ligada e galactose 3 e 3,6-ligadas. Tais ligações diferem daquelas descritas por Bartnicki-Garcia & Lindberg (1972) para o mucorano extraído de *M. rouxii*. Entretanto, estes mesmos autores descrevem grande degradação do mucorano durante os procedimentos de metilação

utilizados para sua caracterização estrutural. Esse fato poderia ter contribuído para que as ligações características desse polímero não tenham sido encontradas nas análises estruturais preliminarmente realizadas com a fração ativa da Sepharose Con-A do eliciador de *M. ramosissimus*. Alternativamente, é plausível supor que as unidades de açúcar encontradas no eliciador de *M. ramosissimus* sejam distintas daquelas descritas por Bartnicki-Garcia & Lindberg (1972) e que, desse modo, embora a composição em monossacarídeos seja bastante semelhante ao do mucorano, outro polímero ainda não descrito para o gênero possa ser componente da parede celular de esporos desse fungo. Cabe lembrar, que até o momento, a parede celular de hifas e esporos de *M. ramosissimus* ainda não foi caracterizada. De qualquer maneira, a análise de ligação glicosídica revelou a ausência de unidades glucosil 3-ligadas ou 3-6-ligadas, que são características de β -glucanos de fungos, indicando que a atividade do eliciador de *M. ramosissimus* não pode ser atribuída à presença de β -glucanos como aqueles derivados de *P.sojae* (Ayers *et al.*, 1976a) ou de *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*) (Yamaguchi *et al.*, 2000).

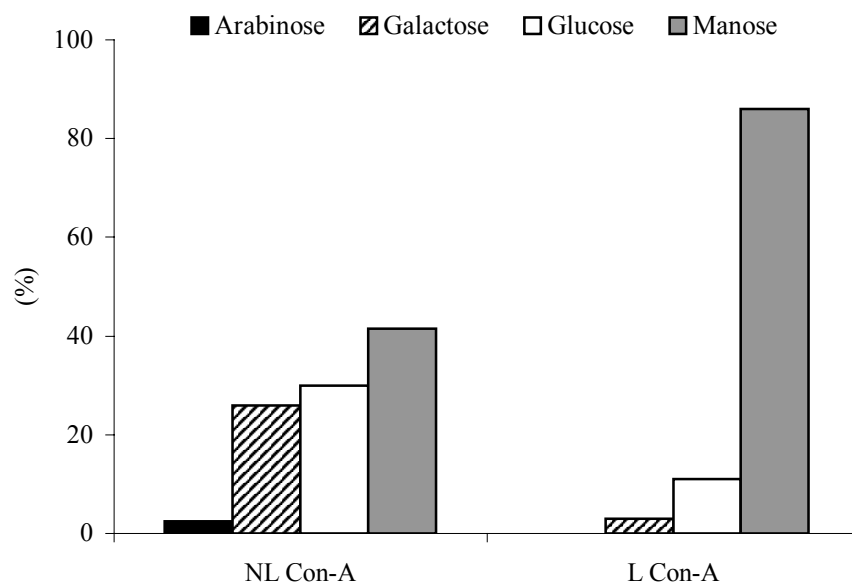


Figura 21. Proporção relativa (%) de monossacarídeos neutros obtida por análises de HPAEC/PAD das frações do eliciador de *M. ramosissimus* resultantes de cromatografia de afinidade em coluna Sepharose Con-A em sistema de FPLC. NL Con-A = fração sem afinidade a matriz; L Con-A= fração com afinidade a matriz da Sepharose Con-A eluída com α - metil-manopiranosídeo.

Tabela 1. Processo de purificação do eliciador do fungo *M. ramosissimus*.

Etapa de purificação		Proporção de monossacarídeos (%)				Rendimento da fração em açúcar (mg)	(%) do conteúdo inicial em carboidratos	Atividade específica(μg de gliceolinas/μg equivalentes de glucose)
Procedimento	Nome do extrato	Ara	Gal	Glc	Man			
Autoclavagem da suspensão de esporos	Sobrenadante	-	-	96	4	469,8	100	14,4
Precipitação etanólica	Concentrado	0,5	3	41,5	55	38,1	8	58,2
Cromatografia por troca iônica	Fração 1 M (ligada)	1	28	17	54	1,4	0,2	68,5
Cromatografia de afinidade	Fração NL Con-A (não ligada)	2,5	26	30	41,5	0,3	0,05	88,0

Tabela 2. Proporção relativa de monossacarídeos ácidos e neutros obtidas por análise em GC/MS de derivados sililados da fração não ligada à Sepharose Con-A (NL Con-A) do eliciador de *M. ramosissimus*.

Monossacarídeos	(%)
Ácido glucurônico	50,0
Ácido galacturônico	10,2
Galactose	6,9
Glucose	6,8
Manose	26,1
Fucose	traços

Dados referentes à cromatografia de exclusão molecular, onde a fração ativa da coluna Sepharose Con A (não ligada) foi aplicada em coluna Bio Gel P-2, indicaram a presença de 2 picos sendo que a atividade indutora de gliceolinas estava presente na fração com massa média molecular aparente entre 700 e 1800 Da (dados não mostrados). Entretanto, não foi possível determinar a composição em monossacarídeos desta fração devido à pequena quantidade de carboidratos da mesma. Moléculas de baixo peso molecular têm sido descritas como capazes de induzir respostas de defesa em plantas. Khan *et al.* (2003) relataram que oligômeros de quitina e quitosano com grau de polimerização de 4-6 aumentaram a síntese da enzima PAL e tirosina-amônia-liase em folhas de soja. Slováková *et al.* (2000) mostraram que um trissacarídeo derivado de galactoglucomanano (eliciador endógeno) foi capaz de induzir resistência não específica ao vírus da necrose de tabaco (TNV) em cotilédones de pepino.

Um resumo do processo de purificação realizado neste trabalho é apresentado na Tabela 1. Ao longo das etapas houve alterações nas proporções de monossacarídeos e concomitante aumento da atividade específica nas frações obtidas, resultados que indicam purificação do eliciador de *M. ramosissimus* pelos processos utilizados.

Diversos polímeros são encontrados na parede celular de fungos, sendo que quitina, quitosano e glucanos são os mais comuns. Glucanos podem estar presentes em esporos de algumas espécies de zigomicetos, inclusive as da ordem dos Mucorales (Ruiz-Herrera, 1992). Heteropolissacarídeos compostos de glucose e outros açúcares também têm sido encontrados na parede celular de fungos, sendo comum a ligação de unidades de glucose ao terminal não redutor de oligossacarídeos presentes em algumas glicoproteínas. Complexos glicoprotéicos ricos em resíduos de manose também são descritos como componentes estruturais de fungos, sendo mais bem caracterizados os derivados de células de leveduras (Ruiz-Herrera, 1992). O glicopeptídeo contendo 12 resíduos manosil derivado de *S. cerevisiae* mostrou ser um eliciador de mecanismos

de defesa em células de tomate, por induzir a atividade da enzima PAL, sendo a capacidade indutora deste eliciador relacionada a presença de manose (Grosskoph *et al.*, 1991). Outros eliciadores de natureza glicoprotéica ou oligossacarídeos contendo resíduos de manose também têm sido descritos (Schaffrath *et al.*, 1995; Schweizer *et al.*, 2000).

Tendo em vista a presença de manose como monossacarídeo neutro predominante nas frações ativas do eliciador de *M. ramosissimus* é possível que este açúcar seja um dos componentes da sua estrutura química. O eliciador purificado de esporos do fungo *Hemileia vastatrix* por Guzzo & Moraes (1997) mostrou ser composto de 88 % de resíduos de manose, seguido de 6,7% de glucose e 4,5 % de galactose, possuindo ligações glicosídicas do tipo β . Este eliciador induziu a síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja (cultivar IAC-8) em concentrações equivalentes a 0,9 μ g de carboidratos, o que demonstra que as células vegetais dessa espécie são capazes de reconhecer moléculas com estas características químicas.

Embora a estrutura química do eliciador do fungo *M. ramosissimus* não tenha sido completamente definida, este trabalho revelou características importantes desta molécula, tais como sua alta estabilidade térmica e a possível presença de ácidos urônicos em sua estrutura. Oligossacarídeos contendo ácidos urônicos derivados de plantas têm sido descritos como eliciadores da síntese de fitoalexinas em diversas espécies vegetais (Côté & Hahn, 1994), porém não foram encontrados relatos de moléculas eliciadoras com essas características derivadas de fungos.

Além de induzir a síntese de fitoalexinas em soja, o eliciador deste fungo sabróbio induz a síntese de fitoalexinas em rubiáceas tropicais (Cordeiro Neto & Dietrich, 1992). Outros relatos indicam que microrganismos sapróbios ativam mecanismos de defesa em plantas, como por exemplo, o fungo *Trichoderma pseudokoningii*. Seus esporos vivos ou autoclavados contêm um

eliciador glicoprotéico com capacidade de induzir a síntese de fitoalexinas em diversas espécies de dicotiledôneas (Braga & Dietrich 1991). Asiegbu *et al.* (1994) relataram a indução de proteínas relacionadas à patogênese (β 1,3 glucanase e quitinase) em abeto infectado pelo fungo sapróbio *Heterobasidion annosum*.

Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho vêm adicionar evidências à sugestão anterior de que fungos sapróbios também são capazes de ativar mecanismos inespecíficos de defesa em plantas (Marques, 1998), o que confere aos tecidos vegetais a capacidade de responder a um potencial patógeno, mesmo que ele seja incapaz de penetrar e se desenvolver dentro da planta.

4.3 Obtenção de oligogalacturonídeos e ensaios de supressão da atividade indutora do eliciador de M. ramosissimus em cotilédones de soja

4.3.1 Obtenção de oligogalacturonídeos

Os perfis de eluição em sistema de HPAEC/PAD dos hidrolisados de ácido poligalacturônico e de pectina de *Citrus* obtidos, respectivamente, por hidrólises enzimática com endopoligalacturonase (EPG) e com ácido trifluoroacético (TFA), encontram-se na Figura 22. Ambos os métodos de hidrólise demonstraram eficácia na obtenção de oligogalacturonídeos (OGAs). O tratamento exaustivo de ácido poligalacturônico com EPG gerou oligômeros com grau de polimerização (GP) 2, 3, 4 e 5 (Figura 22 C). Estes se encontram mais puros devido ao tratamento enzimático e ausência de metilesterificações, além da semipurificação por precipitação etanólica do que aqueles encontrados no hidrolisado de pectina com TFA, onde também foram detectados oligogalacturonídeos com GP >7 (Figura 22 D). Moerschbacher *et al.*

(1999) obtiveram oligômeros com GP menor após autoclavagem de pectina comercial com subsequente precipitação deste material para eliminação de polímeros maiores. Os oligômeros foram isolados após aplicação destes em coluna DEAE-Sephadex e aqueles com GP 2 e 3 exerceram maior supressão da resposta de defesa de trigo. Com base neste trabalho, optou-se por utilizar os hidrolisados de ácido poligalacturônico que continham essas moléculas com pequeno GP.

Os OGAs obtidos por hidrólise com EPG com GP 2-5 foram aplicados (2 mg) em coluna Bio Gel P-2, para a separação desses oligômeros. Após eluição, dois picos foram detectados por ensaio colorimétrico para ácidos urônicos (absorbância 520 nm), conforme mostrado na Figura 23. As frações obtidas foram analisadas por HPAEC/PAD (dados não mostrados), o que indicou que o primeiro pico obtido da coluna estava enriquecido por OGAs com GP 3 e 4 e o segundo por OGAs de GP 2. Pela proporção relativa dos OGAs (Figura 24), observou-se que a fração 11 apresentou-se mais rica em OGAs com GP 4, a 12 em GP 3 e nas demais houve predominância de OGAs com GP 2, indicando que a técnica utilizada foi eficaz na separação das frações, que continham os oligômeros de interesse.

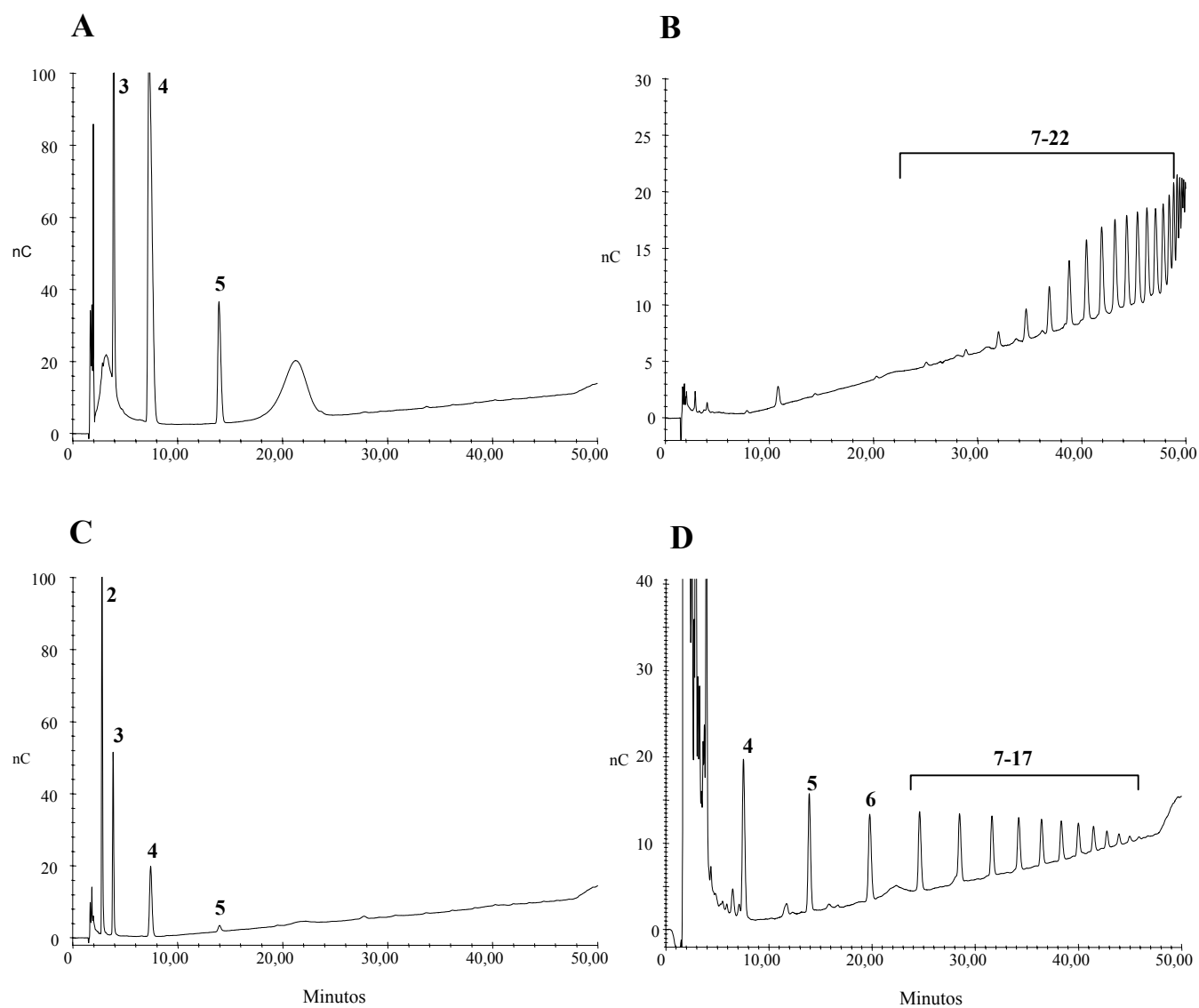


Figura 22. Perfil de eluição em HPAEC/PAD de oligogalacturonídeos obtidos por hidrólise enzimática de ácido poligalacturônico (C) e por hidrólise ácida de pectina de *Citrus* (D). (A) e (B) são padrões de oligogalacturonídeos com GP 3-5 e 7-22, respectivamente.

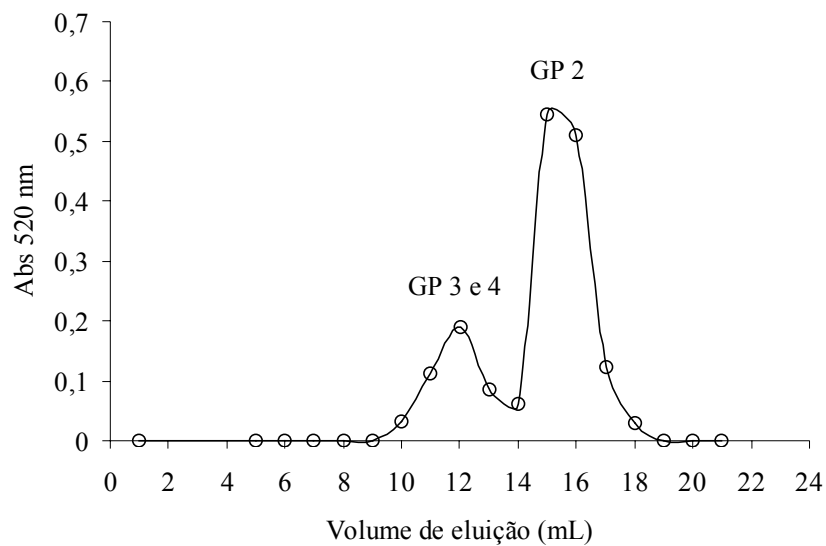


Figura 23. Eluição de oligogalacturonídeos resultantes da hidrólise de ácido poligalacturônico com EPG por cromatografia de exclusão molecular em coluna Bio Gel P-2. GP= grau de polimerização.

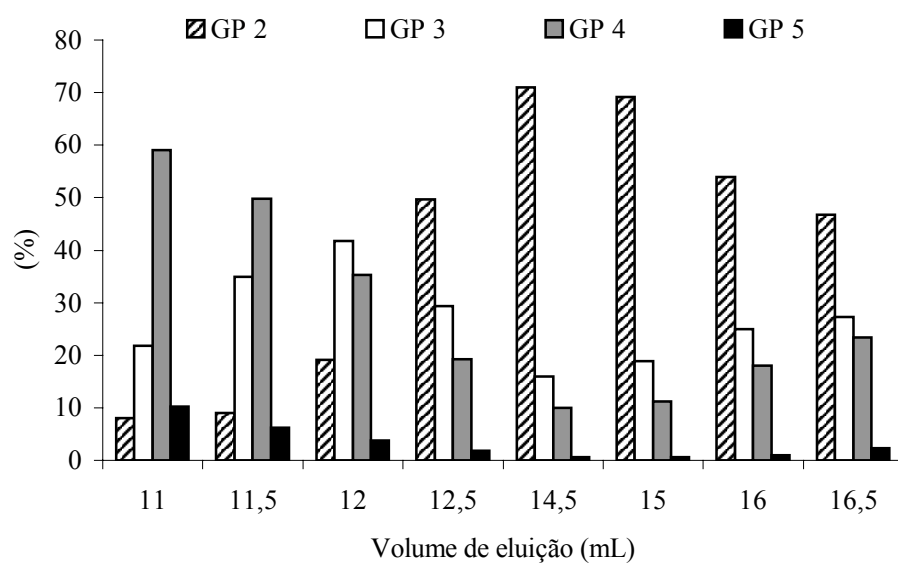


Figura 24. Proporção relativa (%) dos oligogalacturonídeos com diferentes graus de polimerização (GP) obtidos de hidrolisados de ácido poligalacturônico com EPG por fracionamento em coluna Bio Gel P-2.

4.3.2 Ensaios de supressão da atividade indutora do eliciador de *M. ramosissimus*

Para o estudo da possível supressão da indução da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja por oligogalacturonídeos, vários ensaios preliminares de competição com eliciador de *M. ramosissimus* e com o β -glucano de *P. sojae* foram realizados. OGAs derivados do tratamento enzimático com EPG de GP 2-5 foram co-aplicados com estes eliciadores, em diversas concentrações, mas grandes variações foram observadas na resposta dos cotilédones de soja entre as repetições dos ensaios (dados não mostrados). A Figura 25 mostra os resultados referentes ao ensaio de competição com OGAs que apresentou resultados mais reprodutíveis e coerentes com aqueles anteriormente relatados por Silva & Braga (2004). Neste ensaio, o eliciador concentrado de *M. ramosissimus* foi aplicado em cotilédones de soja juntamente com a fração enriquecida da coluna Bio Gel P-2 que continha predominantemente OGAs de GP 3 e 4 (fração 12, Figura 24), resultante de tratamento enzimático de ácido poligalacturônico com EPG. Os OGAs foram co-aplicados nas superfícies cortadas dos cotilédones na proporção 1:1 (na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para 50 $\mu\text{g/mL}$ de eliciador de *M. ramosissimus*). O eliciador de *P. sojae* foi utilizado na concentração 2 $\mu\text{g/mL}$ para 50 $\mu\text{g/mL}$ de OGA. O pH das amostras foi avaliado antes da aplicação nos cotilédones e os valores ficaram entre 5,0 e 6,0, muito próximos aos valor de pH da água destilada utilizada como controle negativo nos ensaios, indicando que a adição de oligômeros de ácido galacturônico não resultou em acidificação do material aplicado e, assim, este fator não teve influência sobre os resultados obtidos.

Foi observada redução na absorbância a 286 nm dos difusatos de cotilédones de soja tratados simultaneamente com eliciador de *M. ramosissimus* e os OGAs (Figura 25 A), indicando um possível efeito supressor da indução/liberação de fitoalexinas ocasionada pelos OGAs. Esse efeito não foi observado para o mesmo tipo de tratamento no ensaio com o β -glucano de *P. sojae*.

As análises dos difusatos realizadas por HPLC revelaram que a quantidade de gliceolina produzida não diferiu entre tratamentos efetuados com eliciador de *M. ramosissimus* e com este co-aplicado com OGAs (Figura 25 B), havendo apenas, produção maior do precursor daidzeína quando houve a co-aplicação. Ao contrário do observado para os dados de absorbância a 286 nm (figura 25 A), diferenças nos teores de gliceolinas foram detectadas para o tratamento conjunto entre o β -glucano de *P. sojae* e os OGAs (Figura 25B).

Silva & Braga (2004) detectaram a supressão da atividade indutora do eliciador do fungo *M. ramosissimus* por OGAs de pequeno GP, com base em dados obtidos por absorbância dos difusatos, mas não analisaram os metabólitos produzidos. Dessa forma, a sugestão dos autores de que os oligômeros co-aplicados com o eliciador de *M. ramosissimus* inibem a síntese de fitoalexinas não parece válida. Pelos resultados mostrados na Figura 25, é plausível supor que o efeito supressor dos OGAs deve ter sido na produção de outros compostos que são detectados por 286 nm, mas que não foram quantificados nas análises de HPLC devido a falta de padrões. Por outro lado, os OGAs exerceram um efeito supressor na atividade indutora de gliceolinas do β -glucano de *P. sojae*, reduzindo consideravelmente o acúmulo destas nos cotilédones de soja (Figura 25 B). O fato de não ter ocorrido redução de absorbância dos difusatos a 286 nm neste tratamento (Figura 25 A), indica que outras rotas metabólicas que levam ao acúmulo de compostos detectados neste comprimento de onda devem ter sido favorecidas em detrimento daquela que leva ao acúmulo de gliceolinas. Estudos recentes têm mostrado que as células de cotilédones de soja têm distintos mecanismos complementares de defesa baseados no controle diferencial da via dos fenilpropanóides. Células próximas à região de infecção com *P. sojae* ou ao tratamento com eliciador (β -glucano) acumulam preferencialmente gliceolinas e as isoflavonas daidzeína e genisteína, além de depositarem polímeros fenólicos na parede celular. Células

distantes dessa região sintetizam conjugados das isoflavonas genisteína e daidzeína (Figura 3), os quais parecem conferir resistência a possíveis re-infecções e serem prontamente hidrolisados no início da infecção (Graham, 1995; Park et al, 2001). Dessa forma, a co-aplicação de OGAs com o β -glucano de *P. sojae* pode ter ocasionado a inibição dos passos finais da rota que leva à síntese de gliceolinas, levando ao acúmulo de outros metabólitos aromáticos solúveis, ou também ao acúmulo dos conjugados glicosilados de daidzeína e genisteína em sua forma malonil, os quais não foram identificados por HPLC.

Desvios da síntese de pterocarpanos foram estudados por Daniell *et al.* (1997) em suspensões celulares de alfafa, tratadas com eliciador derivado da parede celular de leveduras. Juntamente com eliciador, os autores trataram as suspensões com tubericidina, o qual leva a inibição de metiltransferases que são responsáveis pela formação de 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona, que é o precursor principal da síntese de medicarpina. Na presença de tubericidina, as células de alfafa utilizaram rotas alternativas para a síntese de flavonóides, produzindo pequena quantidade de medicarpina e de seus conjugados glicosilados, em favor do acúmulo de flavonas e da fitoalexina licodiona, que não é o tipo de metabólito secundário comumente produzido por esta espécie em resposta a infecções ou tratamentos com eliciadores.

Os resultados obtidos nos ensaios de competição com o eliciador de *M. ramosissimus* confirmam que os OGAs com pequeno grau de polimerização possuem a capacidade de alterar as respostas de defesa induzidas por eliciadores em cotilédones de soja. Esse efeito, entretanto, parece ser dependente do eliciador utilizado, uma vez que a ação dos OGAs sobre a atividade indutora da síntese de fitoalexinas do β -glucano de *P. sojae* foi diferente daquela causada pelo eliciador de *M. ramosissimus*, provavelmente devido ao fato desses eliciadores possuírem características distintas.

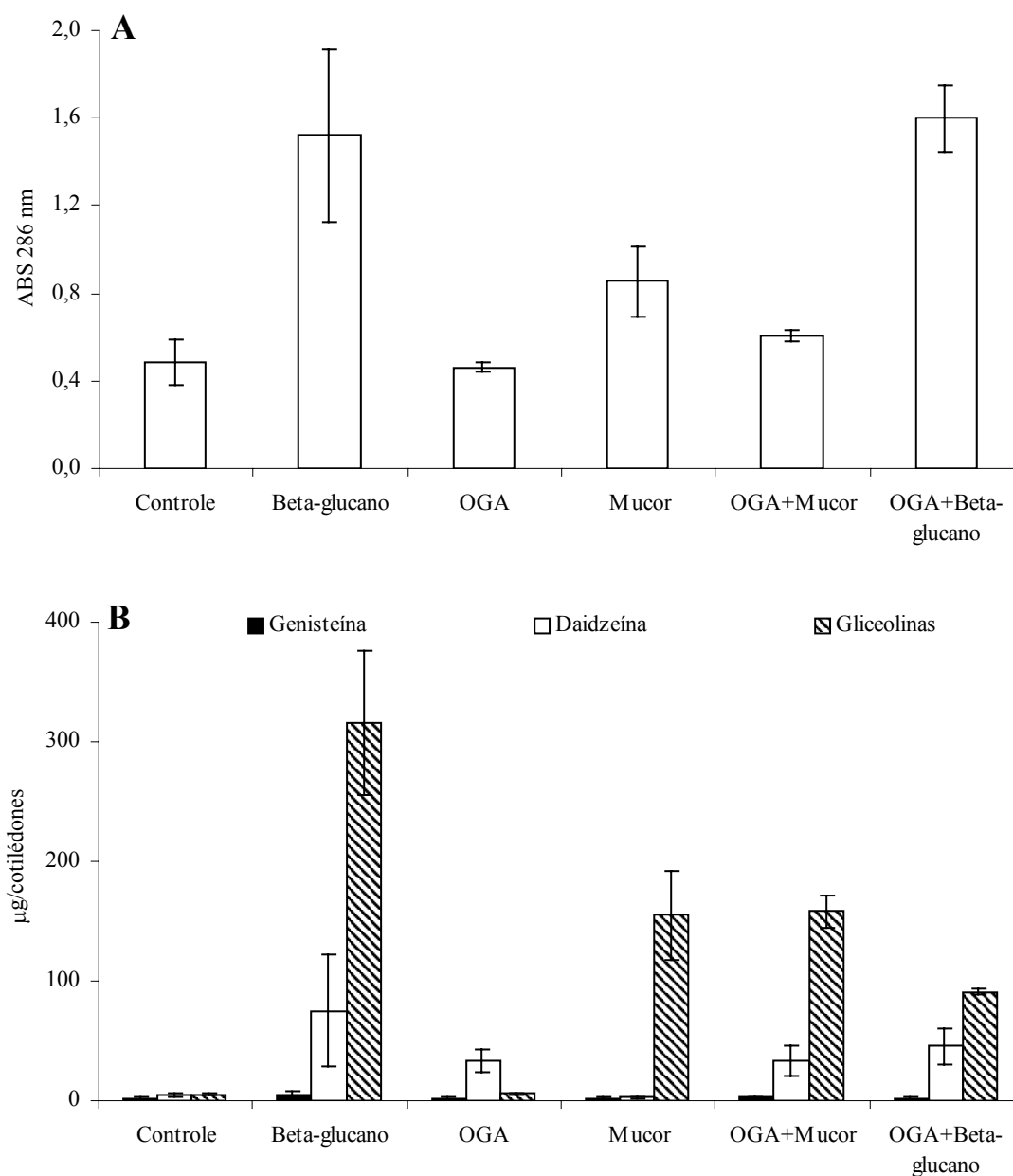


Figura 25. Ensaio de co-aplicação de OGAs com GP 3 e 4 com o eliciador de *M. ramosissimus*. (A) Leitura dos difusatos a 286 nm, (B) Produção de genisteína, daidzeína e gliceolinas analisada por HPLC. Controle = tratamento com água destilada estéril; Beta-glucano = tratamento com o β -glucano de *P. sojae*; Mucor = tratamento com eliciador concentrado de *M. ramosissimus* e OGA= fração contendo predominantemente oligômeros de GP 3 e 4. As barras representam o desvio padrão da média de triplicatas.

O papel destes pequenos oligogalacturonídeos na resistência de plantas a doenças ainda não é bem compreendido. Moerschbacher *et al.* (1999) verificaram supressão da atividade da fenilalanina-amônia-liase (PAL) e de peroxidases em trigo por OGAs com GP 2 e 3 ensaiados juntamente com eliciador de *P. graminis*. Por outro lado, Boudart *et al.* (1995) demonstraram que OGAs com GP 2 e 3, liberados da parede celular de *Phaseolus vulgaris*, aumentaram de 40-70% a eliciação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina em feijão. Esses autores relataram ainda que fragmentos com maior massa molecular, derivados do ramnogalacturonano II, suprimiram a deposição dessas glicoproteínas. Weber *et al.* (1996) verificaram que digalacturonídeos derivados de digestão enzimática de ácido poligalacturônico induziram a morte de células de batata contribuindo com os mecanismos de defesa contra a enterobactéria *Erwinia carotovora*, causadora de podridão nos tecidos desta espécie vegetal.

Os resultados obtidos neste trabalho juntamente com outros encontrados na literatura não deixam dúvidas de que OGAs de pequeno GP possuem a capacidade de alterar a indução da síntese de metabólitos de defesa quando aplicados isoladamente ou em conjunto com eliciadores. Essa ação parece estar relacionada ao desvio nas rotas metabólicas que levam à síntese dessas substâncias de defesa, de maneira que estudos que avaliam a atividade das enzimas nela envolvidas são necessários e fundamentais para elucidar os efeitos desses oligômeros de parede celular e seu papel na regulação das respostas de defesa em plantas.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que esporos do fungo sapróbio *M. ramosissimus* contêm um potente eliciador da síntese de fitoalexinas em cotilédones de soja. Este eliciador é termoestável e age em concentrações micromolares, sendo provavelmente composto por açúcares ácidos e neutros. A atividade indutora de fitoalexinas desse eliciador parece estar relacionada à integridade de sua porção glicídica. O fato desse eliciador não se ligar à Sepharose Con-A, sugere que ligações do tipo β podem estar presentes em sua estrutura, mas a ausência de unidades glucosil 3 e 3,6 ligadas na análise de ligação glicosídica indica que o mesmo não se trata de um β -glucano. Essa sugestão é corroborada pelo fato dos tecidos dos cotilédones de soja responderem de forma metabolicamente diferente a estes dois eliciadores. Em resumo, os dados obtidos neste trabalho indicam que fungos sapróbios, assim como os fitopatogênicos, possuem eliciadores capazes de induzir respostas de defesa em plantas, mesmo não tendo a capacidade de infectá-las. Além disso, confirmam que oligogalacturonídeos com pequeno grau de polimerização podem desviar a síntese de metabólitos de defesa em soja induzida por eliciadores, entretanto, essa atividade parece depender do tipo de eliciador fúngico utilizado.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, P. A., GRAHAM, M. Y. & GRAHAM, T. L. 2001. Effects of soybean genotype on the glyceollin elicitation competency of cotyledon tissues to *Phytophthora sojae* glucan elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **59**: 95-105.
- ANDERSON-PROUTY, A. J. & ALBERSHEIM, P. 1975. Host-pathogen interactions. VIII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. **Plant Physiology** **56**: 286-291.
- AGRAWAL, G. K., RAKWAL R., TOMOGAMI, S. YONEKURA, M. KUBO, A. & SAJI, H. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry** **40**: 1061-1069.
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P.F. & LOW, P. S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology** **90**: 109-116.
- ASIEGBU, F. O., DANIEL, G. & JOHANSSON, M. 1994. Defense related reactions of seedling roots of Norway spruce to infection by *Heterobasidium annosum*. **European Journal of Forest Pathology** **25**:169-178.
- AYERS, A. R., EBEL, J.; VALENT, B. & ALBERSHEIM, P. 1976a. Host-pathogen interactions X. Fractionation and biological activity of elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology** **57**:760-765.
- AYERS A. R., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. & ALBERSHEIM, P. 1976b. Host-pathogen interactions IX. Quantitative assays of elicitors activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology** **57**: 751-759.

- AZIZ, A., HEYRAUD, A. & LAMBERT, B. 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. **Planta** **218**: 767-774.
- BARTINICKI-GARCIA, S & LINDBERG, B. 1972. Partial characterization of mucoran: the glucuronomannan component. **Carbohydrate Research** **23**: 75-85.
- BARTINICKI-GARCIA, S. & REYES, E. 1968. Chemical composition of sporangiophore walls of *Mucor rouxii*. **Biochimica et Biophysica Acta** **65**: 32-42.
- BAUREITHEL, K., FELIX, G. & BOLLER, T. 1994. Specific, high-affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. **The Journal of Biological Chemistry** **269**: 17931-17938.
- BENHAMOU, N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science** **1**: 233-240.
- BOUDART, G., DECHAMP-GUILLAUME, G., LAFITTE, C., RICART, G., BARTHE, J., MAZAU, D. & ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. 1995. Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. **European Journal of Biochemistry** **232**: 449-457.
- BOUÉ, S. M., CARTER, C. H., EHRLICH, K. C. & CLEVELAND, T. E. 2000. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. **Journal of Food and Chemistry** **48**: 2167-2172.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.

- BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 1991. Atividade eliciadora de fitoalexinas em esporos de *Trichoderma pseudokoningii* Rifai. **Hoehe** **18**: 179-187.
- BRAGA, M.R., COSTA, A. P.P. & DIETRICH, S.M.C. 1993. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. **Ciência e Cultura** **45**: 76-80.
- CAMPOS-TAKAKI, G. M. 1984. **Aspectos bioquímicos e ultraestruturais das paredes celulares de fungos da ordem Mucorales (Zygomycetes)**. Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, 229 p.
- CERVONE, F., HAHN, M. G., LORENZO, G., DARVILL. A. & ALBERSHEIM, P. 1989. Host-pathogen interaction. XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense response. **Plant Physiology** **90**: 542-548.
- CERVONE, F., CASTORIA, R., LECKIE, F. & DE LORENZO, G. 1997. Perception of fungal elicitors and signal transduction. *In*: Signal Transduction in Plants. Molecular and cell biology updates:153-177.
- CHEONG, J. J. & HAHN, M. G. 1991. A specific, high-affinity binding site for the hepta β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. **The Plant Cell** **3**: 137-147.
- CHEONG, J. J., BIRBERG, W., FUGEDI, P., COTTI, P., GAREGG, P. J., OGAWA, T. & HAHN, M.G. 1991. Structure-activity relationships of oligo- β -glucoside elicitors of phytoalexin accumulation in soybean. **The Plant Cell** **3**: 127-136.
- CORDEIRO NETO, F. 1992. **Fungos indutores de fitoalexinas em rubiáceas nativas e caracterização parcial do agente indutor obtido de *Mucor ramosissimus***. Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, 167 p.
- CORDEIRO NETO, F. & DIETRICH, S.M.C. 1992. Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae. **Ciência e Cultura** **44**: 342-344.

- COSIO, E. G.; FEGER M.; MILLER, C. J.; ANTELO, L & EBEL, J. 1996. High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. **Planta**: 92-99.
- CÔTÉ, F. & HAHN, M. 1994. Oligosaccharins: structures and signal transduction. **Plant Molecular Biology** **26**: 1379-1411.
- CÔTÉ, F.; CHEONG, J.; ALBA, R. & HAHN, M. G. 1995. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexin synthesis in soybean. **Physiologia Plantarum** **93**: 401-410.
- DANIELL, T., O'HAGAN, D & EDWARDS, R. 1997. Alfafa cell cultures treated with fungal elicitor accumulate flavone metabolites rather than isoflavones in the presence of the methylation inhibitor tubericidin. **Phytochemistry** **44**: 285-291.
- DIXON, R. A. & PAIVA, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell** **7**: 1085-1097.
- DIXON, R. A., HARRISON M. J. & LAMB, C. J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology** **32**: 479-501.
- DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** **28**: 350-355.
- EBEL, J. & COSIO, E.G. 1994. Elicitors of plant defense responses. **International Review of Cytology** **148**: 1-36.
- ELLIS, D.H. 1997. Zygomycetes. *In*: **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. 9th edition. Edward Arnold London. p. 247-277.

- ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T., BOUDART, G. & DUMAS, B. 2000. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry** **38**: 157-163.
- FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C. & CARPITA, N.C. 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry** **197**:157-162.
- GARCEZ, W. S., MARTINS, D., GARCEZ, F. R., MARQUES, M. R., PEREIRA, A. A. P., OLIVEIRA, L. A., RONDON, J. N. & PERUCA, A. D. 2000. Effect of spores of saprophytic fungi on phytoalexin accumulation in seeds of frog-eye spot and canker-resistant and susceptible soybean (*Glycine max* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **48**: 3662-3665.
- GOMÉZ, L.D., BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. 1994. Involvement of active oxygen species and peroxidases in phytoalexin production induced in soybean hypocotyls by an elicitor from a saprophytic fungus. **Ciência e Cultura** **46**: 153-156.
- GRAHAM, T.L. 1995. Cellular Biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. Marcel Dekker. p. 85-116.
- GRAHAM, T. L., & GRAHAM, M. Y. 1989. PMG wall glucan is an efficient elicitor of isoflavones but is not an efficient elicitor of glyceollin in soybeans. **Phytopathology** **79**: 1150-1159.
- GRAHAM, T. L., & GRAHAM, M. Y. 1996. Signaling in soybean phenylpropanoid responses. Dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments. **Plant Physiology** **110**: 1123-1133.

- GRAHAM, T. L., KIM, J. E., GRAHAM, M. Y. 1990. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **3**: 591-601.
- GRAYER, R. J. & KOKUBUN, T. 2001. Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry** **56**: 253-263.
- GROSSKOPH, D. G., FELIX, G. & BOLLER, T. A. 1991. A yeast-derived glycopeptide elicitor and chitosan or digitonin differentially induce ethylene biosynthesis, phenylalanine ammonia-lyase and callose formation in suspension-cultured tomato cells. **Journal of Plant Physiology** **138**: 741-746.
- GUZZO, S. D. & MORAES, W.B. 1997. Purificação e caracterização parcial de um eliciador de fitoalexina em soja, a partir de uredíniosporos de *Hemileia vastratrix*. **Fitopatologia Brasileira** **22**: 396-402.
- HAHN, M.G. 1996. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology** **34**: 387-412.
- HAHN, M. G. & ALBERSHEIM, P. 1978. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology** **62**: 107-111.
- HAHN, M.G., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1981. Host-pathogen Interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. **Plant Physiology** **68**: 1061-1169.
- HAHN, M.G., DARVILL, A., ALBERSHEIM, P., BERGMANN, C., J.J. CHEONG, KOLLER, A. & LÓ, V.M. 1992. Preparation and characterization of oligosaccharide elicitors of phytoalexin accumulation. *In*: **Molecular Plant Pathology** (Volume II): a Practical Approach. Oxford University Press. p. 103-147.

- HAM, K., WU, S., DARVILL, A. G., & ALBERSHEIM, P. 1997. Fungal pathogens secrete an inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- β -1,3 glucanases. **The Plant Journal** **11**: 169-179.
- HAMMOND-KOSACK, K. & JONES, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. *In*: **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. p. 1102-1156.
- HARBORNE, J. B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology** **27**: 335-367.
- JACKSON, A. O. & TAYLOR, C. B. 1996. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. **The Plant Cell** **8**: 1651-1668.
- KHAN, W., PRITHIVIRAJ, B. & SMITH, D. 2003. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology** **160**: 859-863.
- KNOGGE, W. 1996. Fungal infection of plants. **The Plant Cell** **8**: 1711-1722.
- MARQUES, M. R. 1998. **Interação entre uma endopoligalacturonase de *Mucor ramosissimus* (Mucorales) e a pectina da parede celular de *Paullinura marcgravii* (Rubiaceae) na indução de respostas de defesa em plantas**. Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina de São Paulo. São Paulo, SP, 166 p.
- MITHÖFER, A. BHAGWAT, A. A., FEGER, M. & EBEL, J. 1996. Suppression of fungal β -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. **Planta** **199**: 270-275.

- MODOLO, L.V., CUNHA, F.Q., BRAGA, M. R. & SALGADO, I. 2002. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. **Plant Physiology** **130**: 1288-1297.
- MOERSCHBACHER, B. M., MIEREU, M., GRAEBNER, B., NOLL, U. & MORT, A. J. 1999. Small oligomers of galacturonic acid are endogenous suppressors of disease resistance reactions in wheat leaves. **Journal of Experimental Botany** **50**: 605-612.
- MONTESANO, M., BRADER, G. & PALVA, T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology** **4**: 73-79.
- MYSORE, K. S. & RYU, C.M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science** **9**: 97-104.
- NING, J., KONG, F., LIN, B. & LEI, H. 2003. Large-scale preparation of the phytoalexin elicitor glucohexatose and its application as a green pesticide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **51**: 987-991.
- NOTHNAGEL, E. A., McNEILL, M. & DELL, A. 1983. Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins. **Plant Physiology** **71**: 916-926.
- NÜRNBERGER, T. 1999. Signal perception in plant pathogen defense. **Cellular and Molecular Life Science** **55**: 167-182.
- NÜRNBERGER, T. & SCHEEL, D. 2001. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science** **6**: 372-379.
- NÜRNBERGER, T., NENNSTIEL, D., JABS, T., SACKS, W. R., HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Cell** **78** : 449-460.

- NÜRNBERGER, T., NENNSTIEL, D., HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. 1995. Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **92**: 2338-2342.
- PARK, D. S., GRAHAM, M. Y. & GRAHAM, T. L. 2001. Identification of soybean elicitation competency factor, CF-1, as the soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **59**: 265-273.
- PAXTON, J. D. 1995. Soybean phytoalexin: elicitation, nature, mode of action and role. *In*: **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. Marcel Dekker. p. 69-83.
- PELICICE, F. M., DIETRICH, S.M.C. & BRAGA, M.R. 2000. Phytoalexin response of fifteen Brazilian soybean cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **12**: 45-53.
- PEEVER, T. L. & HIGGINS, V. 1989. Suppression of the activity of non-specific elicitor from *Cladosporium fulvum* by intercellular fluids from tomato leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **34**: 471-482.
- REYMOND, P., GRUNBERGER, S., PAUL, K., MULLER, M. & FARMER, E.E. 1995. Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **92**: 4145-4149.
- RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A., MOHNEN, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry** **57**: 929-967.
- ROSE, J. K. C., HAM, K., DARVILL, A.G., ALBERSHEIM, P. 2002. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution as a counterdefense mechanism by plant pathogens. **The Plant Cell** **14**:1329-1345.
- RUIZ-HERRERA, J. 1992. Fungal glucans. *In*: **Fungal cell wall**. 1st edition. CRC Press. p. 59-67.

- SCHAFFRATH, U. SCHEINPFLUG, H. & REISENER, H. J. 1995. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **46**: 293-307.
- SCHIPPER, M. A. A. 1973. A study on variability in *Mucor hiemalis* and related species. **Studies in Mycology**, Baarn, vol. 4, 40p.
- SCHWEIZER, P.; KMECL, A.; CARPITA, N. & DUDLER, R. 2000. A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is recognized by a broad range of cereals. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **56**: 157-167.
- SHIBUYA, N. & MINAMI, E. 2001. Oligosaccharide signaling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **59**: 223-233.
- SHIRAISHI, T., YAMADA, T., SAITOH, K., KATO, T., TOYODA, K., YOSHIOKA, H., KIM, H., ICHINOSE, Y., TAHARA, M. & OKU, H. 1994. Suppressors: determinants of specificity produced by plant pathogens. **Plant Cell Physiology**: 1107-1119.
- SILVA, C. A. & BRAGA, M. R. 2004. Liberação e atividade de moléculas indutoras de fitoalexinas em rubiáceas tropicais: influência da metilesterificação de pectinas. **Revista Brasileira de Botânica** **27**: 379-393.
- SLOVÁKOVÁ, L., LISKOVÁ, D., CAPEK, P. KUBACKOVÁ, M. & KARÁCSONYI S. 2000. Defence responses against TNV infection induced by galactoglucomannan-derived oligosaccharides in cucumber cells. **European Journal of Plant Physiology** **106**: 543-553.
- SMITH, C. J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **The New Phytologist** **132**: 1-45.
- SPIRO, M.D., KATES, K.A., KOLLER, A.L., O'NEILL, M.A., ALBERSHEIM, P. & DARVILL, A.G. 1993. Purification and characterization of biologically active 1,4-linked α -D-

oligogalacturonides after partial digestion of polygalacturonic acid with endopolygalacturonase. **Carbohydrate Research** **247**: 9-20.

SPIRO, M. D., RIDLEY, B. L., EBERHARD, S., KATES, K. A., MATHIEU, Y., O'NEILL, M. A., MOHNEN, D., GUERN, J., DARVILL, A. & ALBERSHEIM, P. 1998. Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. **Plant Physiology** **116**: 1289-1298.

STÄB, M. R. & EBEL, J. 1987. Effects of Ca^{2+} on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **257**:416-423.

SUDHA, G. & RAVISHANKAR, G. A. 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **71**: 181-212.

SZEWCZYK, R. BERNAT, P., MILCZAREK, K., DLUGONSKI, J. 2003. Application of microscopic fungi isolated from polluted industrial areas for polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol reduction. **Biodegradation** **14**: 1-8.

TARCHEVSKY, I. A. 2000. Elicitor-induced signaling pathways and their interaction. **Russian Journal of Plant Physiology** **47**:285-294.

UMEMURA, K., OGAWA N., KOGA, J. IWATA, M. & USAMI. 2002. Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. **Plant Cell Physiology** **43**: 778-784.

VIARD, M. P., MARTIM, F. PUGIN, A., RICCI, P. & BLEIN, J. P. 1994. Protein Phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. **Plant Physiology** **104**: 1245-1249.

- VORWERK, S., SOMERVILLE, S. & SOMERVILLE, C. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science** **9**: 203-209.
- WEBER, J., OLSEN, O., WEGENER, C. & WETTSTEIN. 1996. Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **48**: 389-401.
- YAMAGUCHI, T.; YAMADA, A.; HONG, N.; OGAWA, T. & ISHII, T. 2000. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. **The Plant Cell** **12**: 817-826.
- YAMAGUCHI, T., MAEHARA, Y., KODAMA, O. OKADA M., MATSUMURA, M. & SHIBUYA, N. 2002. Two purified oligosaccharide elicitors, n-acetylchitohepatose and tetraglucosyl glucitol derived from *Magnaporthe grisea* cell walls, synergistically activate biosynthesis of phytoalexin in suspension-cultured rice cells. **Journal of Plant Physiology** **159**: 1147-1149.
- YORK, W. S., DARVILL, A. G., MCNEIL, M., STEVENSON, T. T. & ALBERSHEIM, P. 1985. Isolation and characterization of plant walls and cell wall components. **Methods in Enzymology** **118**: 3-40.
- YU, L.M. 1995. Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. **Proceedings of the National Academy of sciences USA** **92**: 4088-4094.